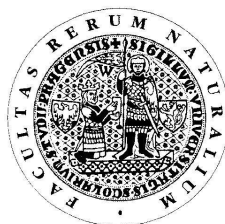


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Karolína Průchová

STANOVENÍ CELKOVÉ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY VE
VYBRANÝCH POTRAVINÁCH A POTRAVINOVÝCH DOPLŇCÍCH
PRŮTOKOVOU INJEKČNÍ ANALÝZOU S CHEMILUMINISCENČNÍ
DETEKČÍ

Determination of Total Antioxidant Capacity in Selected Food Products
and Dietary Supplements by Flow Injection Analysis with
Chemiluminescent Detection

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.

Praha 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM 0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 23.8.2012

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Petru Rychlovskému, CSc., za odborné vedení, pomoc a rady, které mi po dobu řešení mé bakalářské práce poskytoval a taktéž RNDr. Václavu Červenému, Ph.D., za odbornou asistenci.

ABSTRAKT

V této diplomové práci byla úspěšně vyvinuta metoda stanovení celkové antioxidační kapacity průtokovou injekční analýzou s chemiluminiscenční detekcí. Jako chemiluminiscenční činidlo byl použit roztok luminolu v prostředí uhličitanového pufru, s měďnatými ionty jako katalyzátorem. Chemiluminiscenční záření bylo vybuzeáno oxidací roztoku luminolu zředěným roztokem peroxidu vodíku, byla pozorována intenzivní dlouhotrvající chemiluminiscence.

První část diplomové práce je věnována optimalizaci experimentálních podmínek stanovení, včetně konstrukce průtokové měřicí aparatury. Jako standardní látka byla použita kyselina L-askorbová.

V druhé části práce pak byla nově vyvinutá metoda použita pro stanovení celkové antioxidační kapacity reálných potravinových vzorků (čajů, kávy, pív, vín, čerstvých ovocných šťáv, čokolády a vybraných potravinových doplňků). Výsledky analýzy těchto vzorků byly převedeny na jednotky VCEAC, tedy antioxidační kapacitu ekvivalentní antioxidační kapacitě kyseliny L-askorbové v mg/ml pro kapalné vzorky a v mg/g pro vzorky pevné. Byly získány tyto výsledky: čaje 53 – 347 mg/1g suchého produktu; kávy 399-449 mg/g suchého produktu; piva 1,1-1,4 mg/ml; vína 4,2 - 4,8 mg/ml; šťáva z citronu 4,7 mg/ml; šťáva z kiwi 2,1 mg/ml a čokolády 6,4 – 57,5 mg/g.

Spolehlivost stanovení nově vyvinutou průtokovou metodou byla potvrzena analýzou tablety vitamínu C, získané výsledky byly ve shodě s celkovým obsahem antioxidantů uvedených výrobcem.

Klíčová slova:

FIA

Chemiluminiscence

Luminol

Kyselina L-askorbová

ABSTRACT

In this diploma thesis, a functional method for the determination of total antioxidant capacity by flow injection analysis with the chemiluminiscent detection was successfully developed. Luminol in carbonate buffer (composed of Na_2CO_3 , NaHCO_3 and $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$), with Cu^{2+} ions as a catalyst, was used as a chemiluminiscent reagent. Chemiluminiscent radiation was induced by a diluted solution of hydrogen peroxide, a long-lasting chemiluminiscence was observed.

First part of this thesis is dedicated to the optimisation of the experimental conditions for antioxidant capacity measurements as well as to the construction of apparatus for flow measurements. L-ascorbic acid was used as a standard.

In the second part of this thesis the freshly developed method was used to determine total antioxidant capacity of real food product samples, namely tea and coffee samples, beers, wines, chocolates, fresh fruit juices and selected food supplements. Results of this analysis were expressed as a vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) related to standard, in mg/ml for liquid samples and in g/mg for solid samples. Results obtained are: tea samples 53 – 347 mg/1g of dried product, coffee samples 399-449 mg/g of dried product, beers 1,1-1,4 mg/ml, wines 4,2 - 4,8 mg/ml, fresh lemon juice 4,7 mg/ml, fresh kiwi juice 2,1 mg/ml, chocolates 6,4 – 57,5 mg/g.

Reliability of this method was proved by the analysis of a C vitamin tablet, results obtained were in accordance with the total vitamin C content quoted by the producer.

Keywords:

FIA

Chemiluminiscence

Luminol

L-ascorbic acid

Seznam zkratek a symbolů

ATP	adenosintrifosfát
ADP	adenosindifosfát
BODIPY FL EDA	4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionyl ethylenediamin hydrochlorid
CFA	continuous flow analysis (kontinuální průtoková analýza)
CL	chemiluminiscence
CM-H2DCFDA	5-(a-6)-chloromethyl-2'7'- dichlorodihydrofluorescein diacetát
CNS	centrální nervová soustava
DAF-FM	4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FA	flow analysis (průtoková analýza, průtokové metody)
FIA	flow injection analysis (průtoková injekční analýza)
HO	hydroxylový radikál
GSHPx	glutathionperoxidáza
I	intenzita
LOV	lab on valve (technika lab-on-valve)
lum	luminol
NADH	nikotinamidadeninukleotid (redukovaná forma)
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukovaná forma)
$O_2^{\cdot -}$	superoxidový radikál
1O_2	singletový kyslík
per	peroxid vodíku
RNS	reactive nitrogen species (reaktivní formy dusíku)
ROS	reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
$Ru(bpy)_3$	ruthenium-tris(2,2'-bipyridyl) dichlorid
ROO^{\cdot}	peroxylový radikál
RO^{\cdot}	alkoxylový radikál
SFA	segmented flow analysis (segmentová průtoková analýza)
SIA	sequential injection analysis (sekvenční injekční analýza)
TAA	total antioxidant activity (celková antioxidační aktivita)
tabl	tableta

TAC	total antioxidant capacity (celková antioxidační kapacita)
TEMPO-9-AC	4-((9-akridinkarbonyl)amino)-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
TRAP	Total Radical Trapping Parameter (parametr totálního vychytání radikálů)
VCEAC	vitamin C equivalent antioxidant capacity (antioxidační kapacita ekvivalentní antioxidační kapacitě vitamínu C)

OBSAH

1 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	11
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	12
2.1 Průtové metody.....	12
2.1.1 FIA.....	12
2.1.2 SIA a technika lab-on-valve	15
2.2 Luminiscence a chemiluminiscence.....	16
2.2.1 Luminiscence.....	16
2.2.2 Chemiluminiscence.....	18
2.2.2.1 Přednosti chemiluminiscence a její využití.....	18
2.2.2.2 Luminol a chemiluminiscenční reakce.....	19
2.2.2.2.1 Luminol a jeho využití.....	19
2.2.2.2.2 Chemiluminiscenční reakce luminolu.....	20
2.2.2.2.3 Stanovení TAC chemiluminiscenční reakcí.....	22
2.3 Volné radikály.....	22
2.3.1 Specifikace volných radikálů.....	22
2.3.2 Oxidační stres a jeho důsledky.....	23
2.3.3 Vznik volných radikálů v lidském organismu.....	24
2.3.3.1 Vznik na základě endogenních příčin.....	24
2.3.3.2 Vznik na základě externích vlivů.....	26
2.3.4 Pozitivní účinky volných radikálů.....	26
2.4 Antioxidanty.....	26
2.4.1 Charakteristika antioxidantů.....	26
2.4.2 Antioxidanty přijímané potravou.....	27
2.4.2.1 Vitamín C.....	27
2.4.2.2 Tokoferoly.....	28
2.4.2.3 Karotenoidy.....	28
2.4.2.4 Polyfenoly.....	30
2.4.2.5 Mikroelementy a stopové prvky.....	33
2.4.2.5.1 Selen.....	33
2.4.2.5.2 Zinek.....	33
2.4.3 Antioxidanty v lidském organismu.....	34

2.4.4 Celková antioxidační kapacita a její stanovení.....	35
2.4.4.1 Celková antioxidační kapacita.....	35
2.4.4.2 Stanovení TAC metodami TEAC a VCEAC.....	36
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
3.1 Použité přístroje a vybavení.....	37
3.2 Použité chemikálie.....	37
3.3 Použité vzorky s antioxidačními účinky.....	38
3.3.1 Vzorky s přírodními antioxidanty.....	38
3.3.1.1 Čokolády.....	38
3.3.1.2 Čaje.....	38
3.3.1.3 Kávy.....	39
3.3.1.4 Vína.....	39
3.3.1.5 Piva.....	39
3.3.1.6 Čerstvé šťávy.....	39
3.3.2 Vzorky se syntetickými antioxidanty.....	39
4 VÝSLEDKY MĚŘENÍ.....	41
4.1 Princip průtokové chemiluminiscenční metody stanovení TAC.....	41
4.2 Měření s aparaturou FIA ve dvoukanálovém uspořádání.....	42
4.2.1 Hledání vhodného složení chemiluminiscenčního roztoku.....	43
4.2.2 Optimalizace podmínek průtokového stanovení.....	44
4.2.2.1 Postup přípravy chemiluminiscenčního roztoku.....	45
4.2.2.2 Stanovení optimálních koncentrací peroxidu a luminolu....	45
4.2.2.3 Zjištění optimálních průtokových rychlostí luminolu a peroxidu.....	47
4.2.2.4 Stanovení optimálního pH.....	48
4.2.2.5 Stanovení optimální koncentrace CuSO ₄	49
4.2.3 Měření antioxidační kapacity se standardem troloxem.....	50
4.3 Měření s aparaturou FIA ve tříkanálovém zapojení.....	52
4.3.1 Měření s třetím kanálem připojeným 5 cm před kyvetu.....	52
4.3.2 Měření se zapojením třetího kanálu přímo na kyvetě.....	54
4.3.3 Měření v konečném FIA zapojení.....	57
4.3.3.1 Finální optimalizační podmínky.....	58
4.3.3.2 Kalibrační závislost kyseliny L-askorbové.....	60
4.3.3.3 Základní charakteristiky stanovení TAC vztažené	

na standard kyseliny L-askorbové.....	61
4.3.3.4 Měření reálných vzorků.....	61
4.3.3.4.1 Výsledky měření TAC čajů.....	62
4.3.3.4.2 Výsledky měření TAC vzorků kávy.....	64
4.3.3.4.3 Výsledky měření TAC čokolád.....	65
4.3.3.4.4 Výsledky měření TAC piv, vín a čerstvých ovocných šťáv.....	66
4.3.3.4.5 Výsledky měření TAC v syntetických doplňcích stravy.....	67
5 DISKUZE ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ.....	69
6 ZÁVĚR.....	71
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	72

1 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Diplomová práce úzce navazuje na bakalářskou práci Luminiscenční stanovení celkového obsahu antioxidantů ve vybraných potravinových doplncích, ve které bylo vypracováno dávkové chemiluminiscenční stanovení celkové antioxidační aktivity v potravinových doplncích. Cílem diplomové práce pak bylo převedení této metody na průtokové stanovení technikou FIA. Druhým podstatným úkolem pak bylo aplikovat vytvořenou průtokovou metodu na stanovení celkové antioxidační aktivity přírodních i syntetických antioxidantů ve vybraných potravinách a potravinových doplncích

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Průtokové metody

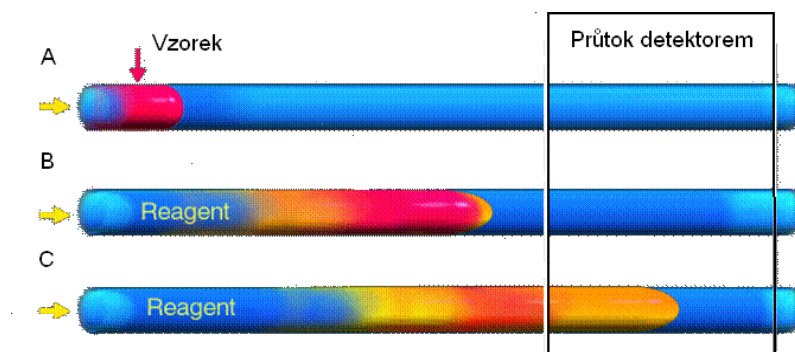
K analýze série vzorků je možno přistupovat dvěma způsoby: použitím dávkové nebo průtokové metody.¹ Pro analýzu velkého množství vzorků požadovanou v krátkém časovém intervalu jsou s oblibou využívány metody průtokové analýzy (Flow Analysis - FA). FA zahrnují všechny techniky, kde jsou kapalné vzorky zaváděny, zpracovávány a detegovány v protékajícím médiu.^{2, 3} Lze je rozdělit do čtyř kategorií: na průtokové metody segmentované vzduchem, nesegmentované kontinuální průtokové systémy, průtokovou injekční analýzu a sekvenční injekční analýzu.⁴ V první jmenované kategorii a některých starších nesegmentovaných průtokových systémech jsou vzorky nasávány do pohybující se kapaliny konstantní průtokovou rychlostí po určitou dobu.⁴ Určité zdokonalení je v případě segmentované průtokové analýzy SFA - Segmented Flow Analysis (někdy též nazývána CFA – Continuous Flow Analysis podle jejího názvu uvedeného L. T. Skeggsem⁵) dosaženo zaváděním bublinek vzduchu mezi jednotlivé vzorky do proudu nosného toku. Jejich funkcí je oddělit od sebe nasáté vzorky, usnadnit jejich promíchání s reagentem bez rizika kontaminace dalšími vzorky a minimalizovat disperzi.^{4, 6} Bublínky jsou odstraněny před jejich vstupem do detekční průtokové cely.

Nevýhodami starších kontinuálních metod i SFA je vysoká spotřeba vzorků a reagentů, v případě SFA i nutnost častého promývacího cyklu.⁶ Tyto metody byly postupně nahrazovány nekontinuálními automatickými systémy, průlomem bylo představení koncepce nové zdokonalené průtokové metody FIA Jaroslavem Růžičkou a E.H. Hansenem v roce 1975.^{6, 7, 8} Problémy spojené s předchozími technikami byly touto metodou odstraněny, přínosem byla i řada dalších vylepšení. Od té doby se stanovením pomocí FIA zabývaly tisíce vědců a bylo zveřejněno na 20000 publikací s touto tematikou.⁸

2.1.1 FIA

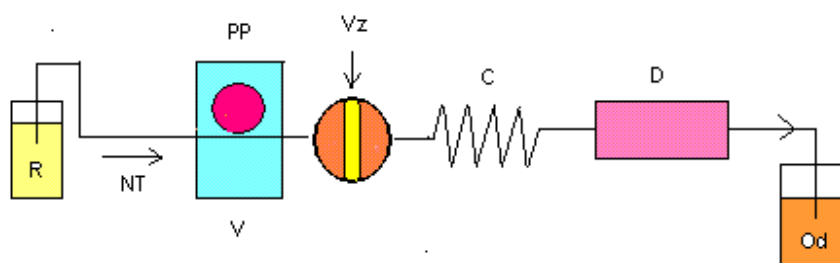
Metoda FIA, neboli průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis) je založena na injektování vzorku do kontinuálního průtoku nosného toku, do něhož jsou

současně přiváděny ostatní reagenty s předem nastavenými průtokovými rychlostmi. Disperzí vzorku je v proudu reagentů vytvářen koncentrační gradient. Zároveň dochází k tvorbě produktu v zóně nadávkovaného vzorku při kontaktu s reagenty. Odrazem obou faktorů je výsledný signál produktu nabývající parabolického tvaru s proměnlivou intenzitou v závislosti na reakční době.^{1,7}



Obr. 2.1.: Schéma procesu disperze vzorku v proudu nosného toku¹: A. Vzorek nadávkován do proudu reagentu. B. Disperzí je vzorek míchán s reagentem, vznik produktu (žlutý). C. Výsledný produkt donesen proudem reagentu do detektoru.

Doba reakce je kontrolována průtokovou rychlostí, objemem a geometrií hadiček, proto je časový interval mezi injektováním vzorku a detekcí analytu reprodukovatelný, stejně tak i rozsah disperze. Vytvořený koncentrační gradient je axiálně rozšiřován při pohybu kapaliny reakční cívkou. Reakční product je zaznamenáván detektorem během průchodu zúčastněných látek průtokovou celou a zobrazován na monitoru počítače ve formě píků. Pohyb všech kapalin *průtokovými hadičkami* je zajišťován peristaltickou pumpou.^{1,7}



Obr. 2.2.: Nejjednodušší jednonálové zapojení průtokové injekční analýzy: R-reagent, NT-nosný tok, PP-peristaltická pumpa, V- dávkovací ventil, Vz-vzorek, C- reakční cívka, D-detektor, Od-odpad

Pojem „injekční“ byl zaveden v souvislosti s původním způsobem dávkování vzorku injekční stříkačkou přes septum přímo do proudu reagentu. V současné době jsou namísto septa používány rotační ventily.⁶

V porovnání s SFA je v metodě FIA průtokový systém hadiček rovnější, tok je laminární, nadávkované vzorky nejsou segmentovány bublinkami vzduchu, není zapotřebí promývací cyklus. Hlavní výhodou je skvělá reprodukovatelnost získaných výsledků, která může být dosažena bez větších problémů a nákladů.⁶

Z dalších předností je třeba jmenovat tyto:⁶

- *možnost automatizace velkého množství analýz s použitím jednoduchého experimentálního zařízení*
- *nízká spotřeba vzorků a reagentů (v řádech mikrolitrů-odtud název mikrofluidní technika¹)*
- *možnost provedení více analýz v krátkém čase*
- *kratší reakční doba (3-60s)*

Slabou stránkou této techniky je použití peristaltických pump. Flexibilní hadičky, které tyto pumpy vyžadují, sebou přináší riziko změn toků vzorku a reagentů kvůli deformaci hadiček, což následně vyžaduje recalibraci systému. Jsou velmi náchylné k poškození také v přítomnosti agresivních reagentů, jako jsou hydroxidy, kyseliny a některá použitá organická rozpouštědla⁶.

Metoda FIA se stala cennou metodou pro četná stanovení v mnoha laboratořích. Je široce využívána např. při stanovení obsahu látek chemiluminiscenčními reakcemi zejména ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu, v oblasti životního prostředí a biomedicíně.^{9, 10} Nejvíce populární jsou reakce využívající luminol jako chemiluminiscenční činidlo.

Tab 2.1: Příklady stanovení látek metodou FIA chemiluminiscenčními reakcemi luminolu⁹

analyt	matrice vzorku	reakce	LOD
penicilin G	vodná	luminol- H ₂ O ₂ CL* katalyzátory [Fe(CN) ₆] ³⁻ a [Fe(CN) ₆] ⁴⁻	12ng/μl
rutin	jerlín japonský	luminol- K ₃ [Fe(CN) ₆] CL*	6,7·10 ⁻⁹ g/ml
Co ²⁺	říční, mořská a stočená voda z kohoutku	luminol-CO₂ CL* (CO ₂ zesiluje chemiluminiscenci)	5·10 ⁻¹³ mol/dm ³
Cr ³⁺	voda stočená z kohoutku	luminol-H₂O₂ CL*	0.5 μg/ml

Tab 2.1: Příklady stanovení látek metodou FIA chemiluminiscenčními reakcemi luminolu pokračování⁹

analyt	matrice vzorku	reakce	LOD
vitamín C	mungo klíčky, rajčatové slupky	luminol –Fe ²⁺ –Na ₂ B ₄ O ₇ –KOH CL*	0.2 ng/ml
kyselina tříslová	chmelové kuličky	inhibice luminol –NaOH–Cu ²⁺ CL*	9·10 ⁻⁹ mol/dm ³
jodid	moč	luminol –Co ²⁺ CL*; detekce jódu vzniklého reakcí s K ₂ Cr ₂ O ₇	10 µg/l
cholesterol	krevní sérum	luminol –Co ²⁺ CL*; detekce H ₂ O ₂ za účasti cholesterol oxidázy	0.1 mg/l

*CL-chemiluminiscence

**jerlín japonský (*Sophora japonica* L)- používáný v tradiční čínské medicíně

2.1.2 SIA a technika lab-on-valve (LOV)

Metoda sekvenční injekční analýzy (SIA) byla poprvé představena v roce 1990 Jaroslavem Růžičkou¹¹ a je v současné době již velmi rozšířenou technikou pro měření on-line s automatickým řízením dávkování vzorku i reagentů počítačem. Jejího mnohostranného využití je dosaženo díky selekčnímu ventilu, kde každý vstup (port) může být použit pro odlišnou operaci.¹² Jednotlivé operace (pozice selekčního ventilu, délka tahu pístu pro dávkování odlišných objemů vzorku) je možno libovolně kombinovat vhodným naprogramováním počítače.

Zdokonalením u metody SIA je použití skleněných pístových pump namísto peristaltických, které mohou být použity i pro agresivní reagenty, a spotřeba výrazně menšího objemu reakčních činidel, jež jsou programově dávkována do systému.⁶

Zatímco metoda FIA je založena na přímém plynulém konstantním toku, SIA využívá změn přímého a zpětného toku. Po nasátí všech reagentů do systému pomocí vícecestného selekčního ventilu a pístového čerpadla je pohyb pístu obrácen, dochází k promísení reagentů a vzniku produktu, který je následně dopraven do detekčního systému. Nevýhodou je snížení frekvence dávkování vzorků.¹³

Technika lab-on-valve je miniaturizovanou formou sekvenční injekční analýzy. Součástí kompaktního systému umístěného na vrchu selekčního ventilu je průtoková

mikrocela koncipovaná tak, aby obsahovala veškeré zařízení potřebné pro manipulaci s chemickými činidly i pro detekci.¹⁴ Tato mikrofluidní zařízení vzbuzují v posledních letech velkou pozornost, zejména pro jejich využití v medicíně, farmacii, životním prostředí a analýze potravin.¹⁵

2.2 Luminiscence a chemiluminiscence

2.2.1 Luminiscence

Při dodání různých forem energie (absorbci záření v UV nebo VIS oblasti, chemickou reakcí,..) může dojít k přeskoku *elektronu* základní hladiny, kterou představuje nejvyšší obsazený molekulový orbital (zvaný též HOMO - The Highest Occupied Molecular Orbital) do nejnižšího neobsazeného molekulového orbitalu (zvaný též LUMO- The Lowest Unoccupied Molecular Orbital).¹⁶ Tento stav je značně nestabilní a velmi energeticky bohatý. Část energie může být uvolněna kolizními deaktivacemi (nezářivými přechody), zbylá část je emitována v podobě energetických kvant jako **luminiscenční záření**.^{16, 17}

Podle formy dodané energie, kterou byla luminiscence vyvolána, lze rozlišit různé druhy luminiscence. Přehledně jsou shrnuty v tabulce 2.2.

Tab 2.2: *Druhy luminiscence*¹⁸

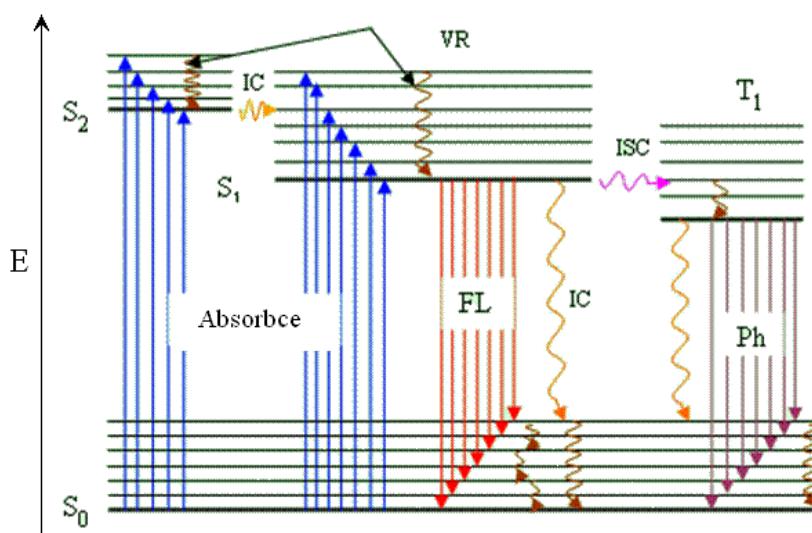
druh luminiscence	excitace
chemiluminiscence	chemickou reakcí
fotoluminiscence	fotony
bioluminiscence	biochemickým procesem
elektroluminiscence	injekcí elektronu nebo díry
triboluminiscence	třením
termoluminiscence	tepelnou energií
katodoluminiscence	katodovými paprsky (e-)
sonoluminiscence	ultrazvukem
radioluminiscence	γ -zářením

V případě **(foto)luminiscence** lze rozlišit emitované záření jako **fluorescenci** nebo **fosforescenci**.^{16, 17}

Při *fluorescenci* přejde elektron vibrační relaxací (nezářivým přechodem) molekuly z excitovaného *singletového stavu* na nejnižší *základní* vibrační hladinu tohoto stavu, následně dojde k vyzáření energie ve formě fluorescence a elektrony se vrací zpět do různých vibračních podhladin *základního elektronového singletového stavu*. *Přechod je spinově povolený, má tedy krátkou dobu života*.^{16, 17}

Při *fosforescenci* přejde elektron interkombinační konverzí (nezářivým přechodem) z excitovaného singletového stavu na vyšší a následně i na základní vibrační hladinu tripletového stavu. Přechod z tripletového stavu na základní hladinu singletového stavu je spinově zakázaný, má tedy dlouhou dobu života a označuje se jako fosforescence.^{16, 17}

Pochody při luminiscenci jsou dobře vystiženy na Jablonského diagramu na obrázku 2.3.



Obr. 2.3.: Jablonského diagram: *E* - energie, *VR* - vibrační relaxace, *ISC* - mezisystémová konverze, *IC* - vnitřní konverze, *FL* - fluorescence, *Ph* - fosforescence, *S*₁ a *S*₂ - singletové stavy, *T*₁ - tripletový stav¹⁹

Luminiscenci mohou poskytovat zejména látky s konjugovanými dvojnými vazbami, především aromáty a látky s rigidní planární multicyklickou strukturou¹⁷. Záření může být zhašeno zejména molekulárním kyslíkem, řadou anorganických kationtů a organických látek nebo intermolekulárním zhašením neelastickými srážkami mezi excitovanými a neexcitovanými částicemi.¹⁷

2.2.2 Chemiluminiscence

V případě chemiluminiscence nedochází k absorpci fotonů, veškerá energie potřebná pro vytvoření excitovaných elektronových stavů a následnou emisi záření je získána z chemické reakce. V přeměně chemické energie na světelnou mohou být zahrnuty reaktanty, meziprodukty i produkty reakce.^{20, 21} K vyzáření energie může dojít buď ze singletového (jako u fluorescence) nebo z tripletového stavu (jako u fosforescence)^{21, 22}

Někdy je chemiluminiscence označována jako studené světlo, neboť se při ní neuvolňuje tepelná energie.²³ Populárním příkladem tohoto typu záření jsou například svítící tyčinky – „Light Sticks”.²⁴

Tab 2.3: Příklady látek poskytujících chemiluminiscenční světlo po interakci²⁵

Látky využitelné k získání chemiluminiscenčního záření		
3-aminofthalát (luminol)	SF ₂ ²⁶	S ₂ ²⁷
CN ²⁸	HSO ²⁹	OH ²⁹
HCF ³⁰	IF ³¹	oxyluciferin ³²
HF ³⁰	N-methylakridon ³³	Ru(bpy) ₃ ³⁴
HCHO ³⁵	nitrosoaminy ³⁶	SO ₂ ³⁷
CH ₃ Se ³⁸	NO ₂ ³⁹	

Bylo zjištěno, že přidavkem určitých iontů s katalytickými schopnostmi lze v poměrně širokém rozsahu úměrně zvyšovat i intenzitu chemiluminiscence.^{40, 41} Takovými ionty mohou být Cr³⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Co²⁺, Ni²⁺ a Cu²⁺.⁴¹

2.2.2.1 Přednosti chemiluminiscence a její využití

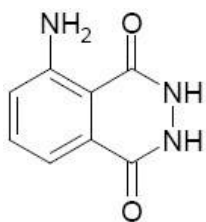
Chemiluminiscence zaujímá své místo mezi spektroskopickými technikami zejména díky své vysoké citlivosti, selektivitě (světelný signál vzniká pouze interakcí s analytem) a širokému dynamickému rozsahu, díky němuž lze současně měřit slabší i silnější signály.^{17, 42}

Je široce využitelná v oblastech životního prostředí (pro sledování množství plyných látek v emisích a imisích), potravinářském průmyslu, klinické a farmaceutické analýze, biochemii a biologii (chemiluminiscenční detekce v biosenzorech).^{42, 43}

2.2.2.2 LUMINOL A CHEMILUMINISCENČNÍ REAKCE

Oxidace luminolu je provázena intenzivní chemiluminiscencí s modrým světlem, proto je luminol široce využíván jako chemiluminiscenční reagent.

2.2.2.2.1 Luminol (3-Aminoftalhydrazid¹⁹) a jeho využití



Obr.2.4: *Struktura luminolu¹⁹*

Luminol je lehce nažloutlou krystalickou látkou, velmi omezeně rozpustnou ve vodě, ale dobře rozpustnou v alkalických vodných roztocích (optimálně při pH 9-10). Je stabilní při pokojové teplotě, citlivý na světlo.¹⁹

Luminol je hojně využíván v mnoha oblastech. V kriminalistice je používán k odhalení krvavých skvrn. Železo, přítomné v krvi, je katalyzátorem chemiluminiscenční reakce luminolu v bazickém prostředí s peroxidem vodíku, proto lze skvrnu po reakci s takovýmto roztokem dobře identifikovat díky její intenzivní modré chemiluminiscenci.¹⁹ Na chemiluminiscenci luminolu je založen i důkaz bojových nervových plynů tabunu a sarinu.⁴⁴ V klinických a imunologických laboratořích se využívá jako marker či jako látka pro imunosenzorickou detekci.⁴⁵ V biomedicině jsou jeho aplikace velmi časté. Tab 2.4 ukazuje jeho využití pro detekci různých druhů reaktivního kyslíku.⁴⁶

Tab 2.4: *Druhy reaktivního kyslíku detegované luminolem*

ROS	vzorec	detekční látky
Peroxid vodíku	H_2O_2	Dihydroxycalcein AM, Dihydrorhodamin 6G, Luminol , Lucigenin
Kyselina chlorná	$HOCl$	Dihydrorhodamin 123, Luminol
Oxid dusnatý	NO	DAF-FM, DAA, Luminol
Peroxylový radikál	$ROO\cdot$	BODIPY FL EDA, Luminol , <i>cis</i> -Parinaric acid
Peroxynitritový anion	$ONOO^-$	H_2DCFDA , Coelenterazine, Dihydrorhodamin 123, Luminol
Superoxidový anion	$\cdot O_2^-$	Coelenterazine, Dihydroethidium, Lucigenin, Luminol , TEMPO-9-AC

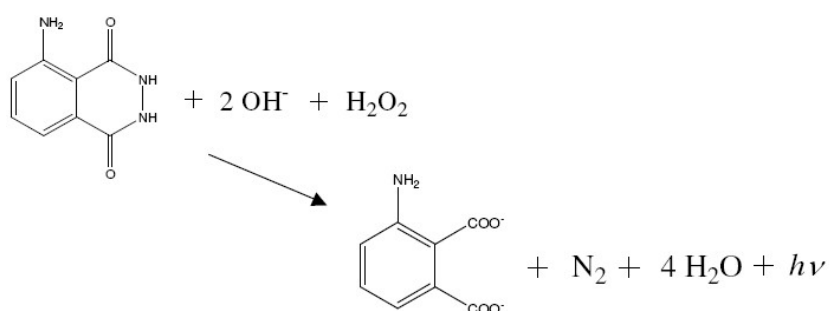
Luminol je též oblíbeným chemiluminiscenčním činidlem pro stanovení látek průtokovými metodami. Příklady jeho aplikací při stanovení metodou FIA jsou uvedeny v tabulce 2.1.

2.2.2.2.2 CHEMILUMINISCENČNÍ REAKCE LUMINOLU²⁶

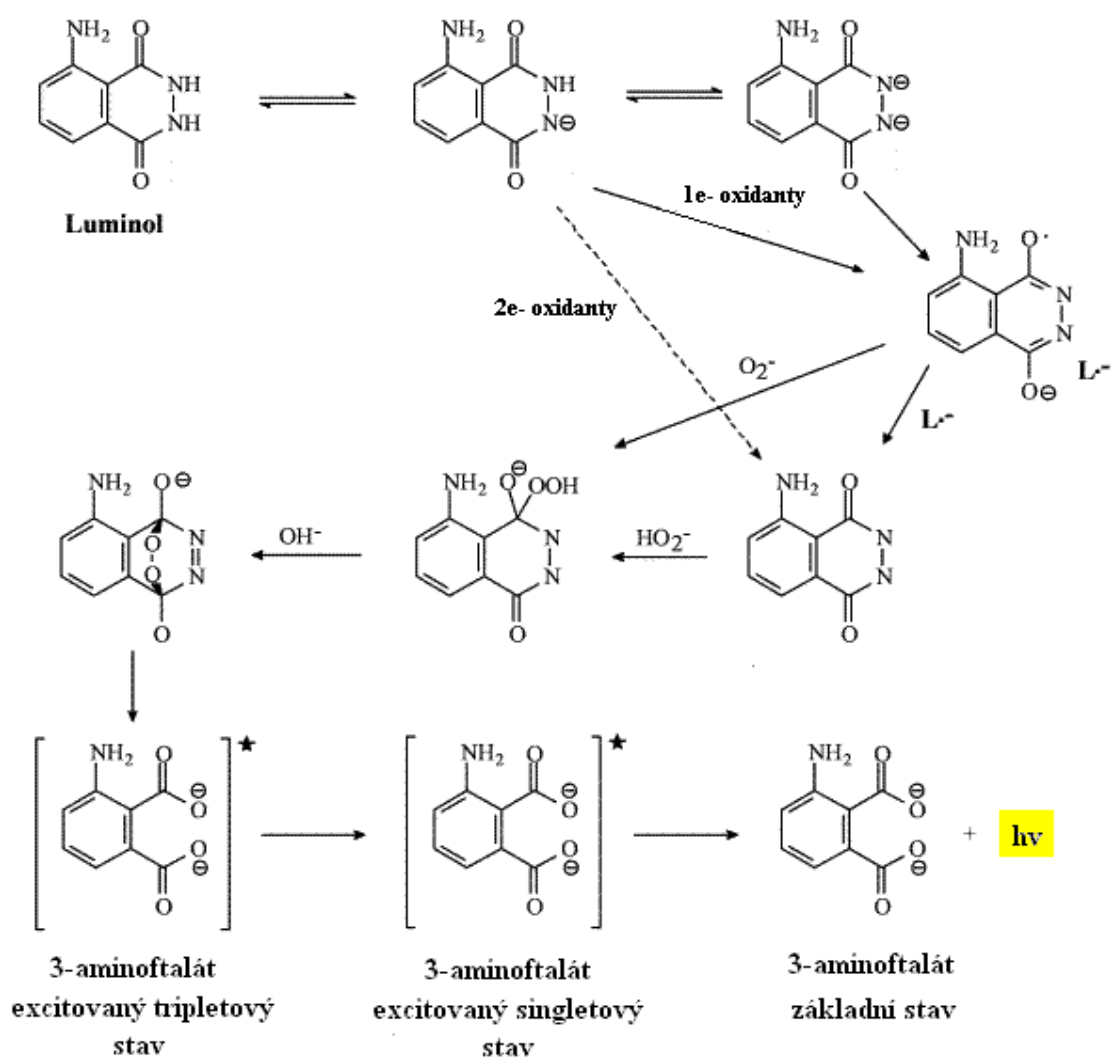
Pokud je luminol v bazickém vodném prostředí vystaven reakci s oxidačním činidlem jako je například $K_3[Fe(CN)_6]$, nebo peroxid vodíku, je degradován za současného uvolnění světelné energie.²⁰

Při oxidaci luminolu peroxidem vodíku v bazickém prostředí dochází k chemické excitaci do tripletového stavu a vzniku dianiontu kyseliny 3-aminoftalové,¹⁹ následně přechází molekula mezisystémovým přechodem na anion v singletovém stavu o stejné energii.²¹ Ze singletového stavu je molekulou uvolňováno chemiluminiscenční (fluorescenční) záření,²¹ detegované spektrometrem jako fluorescenční emisní spektrum (obr.2.6).

Během reakce je uvolňován dusík. Přechod do tripletového stavu může být zapříčiněn právě ztrátou molekuly dusíku nebo dodáním energie jiným procesem.²¹ Celkové schéma chemiluminiscence luminolu je na obrázku 2.



Obr.2.5: Celková rovnice chemiluminiscence luminolu⁴⁰



Obr.2.6: Nejvíce akceptovaný mechanismus chemiluminiscenční reakce luminolu: $\text{L}^{\cdot -}$ luminolový radikál¹⁹

2.2.2.2.3 Stanovení celkové antioxidační kapacity (TAC) chemiluminiscenční reakcí

Chemiluminiscenční reakce luminolu může být využita pro stanovení celkové antioxidační kapacity. Tato metoda stanovení byla poprvé uvedena v roce 1991 a v roce 1999 pojmenována jako analýza TRAP založená na chemiluminiscenci. TRAP je zkratkou pro Total Radical Trapping Parameter (parametr totálního vychytání radikálů).^{47, 48} Je založena na eliminaci radikálů vznikajících při reakci luminolu s oxidačním činidlem, často peroxidem vodíku.⁴⁹ Po přidání látky s antioxidačními účinky jsou vzniklé radikály redukovány, důsledkem je zhášení chemiluminiscence. Tento jev lze na záznamu ve spektru dobře identifikovat jako pokles intenzity sledovaného záření. Velikost tohoto poklesu je úměrná antioxidační kapacitě sledované látky (chemiluminiscence je obnovena po intervalu lineárně úměrnému molární koncentraci přidaného antioxidantu⁴⁹).

2.3 Volné radikály

2.3.1 Specifikace volných radikálů

Volnými radikály se rozumí atomy či molekuly obsahující alespoň jeden orbital s jedním nepárovým elektronem, zapříčiňujícím jejich nestabilitu.⁵⁰ Jsou proto velmi reaktivní, do stabilní konfigurace potřebují doplnit jeden elektron, který získávají oxidací jiné sloučeniny. V lidském organismu se jedná zejména o reaktivní formy kyslíku a dusíku, neboli ROS (Reactive Oxygen Species) a RNS (Reactive Nitrogen Species).⁵¹

Tab 2.5: *Reaktivní formy kyslíku*^{158, 52}

R e a k t i v n í f o r m y k y s l í k u			
Vonné radikály:		Nejsou volnými radikály:	
superoxid	$O_2^{\cdot -}$	peroxid vodíku	H_2O_2
hydroxylový radikál	HO^{\cdot}	kyselina chlorná	$HClO$
peroxyl	ROO^{\cdot}	ozon	O_3
alkoxyl	RO^{\cdot}	singletový kyslík	1O_2
hydroperoxyl	HO_2^{\cdot}		

Tab 2.6.: Reaktivní formy dusíku^{158, 52}

R e a k t i v n í f o r m y d u s í k u			
Volné radikály		Nejsou volnými radikály	
oxid dusnatý	NO•	nitrosyl	NO ⁺
oxid dusičitý	NO ₂ •	nitroxyl	NO-
Nejsou volnými radikály		kyselina dusitá	HNO ₂
peroxynitrit	OONO-	oxid dusitý	N ₂ O ₃
alkylperoxynitrit	ROONO	oxid dusičitý	N ₂ O ₄
kyselina peroxydusitá	HOONO	nitronium	NO ₂ ⁺

2.3.2 Oxiдаční stres a jeho důsledky

Pokud je produkce ROS a RNS v organismu nadměrná (zejména superoxidových a NO radikálů) nebo je-li antioxidační obrana organismu nedostatečná, může tato situace vést k takzvanému **oxidačnímu stresu**, vedoucímu v krajních případech až k vážným poškozením DNA a jiných biomolekul, buněk a vzniku řady onemocnění.^{50, 51}

Tab 2.7: Příklady onemocnění pojících se s nadbytkem volných radikálů a ROS⁵³

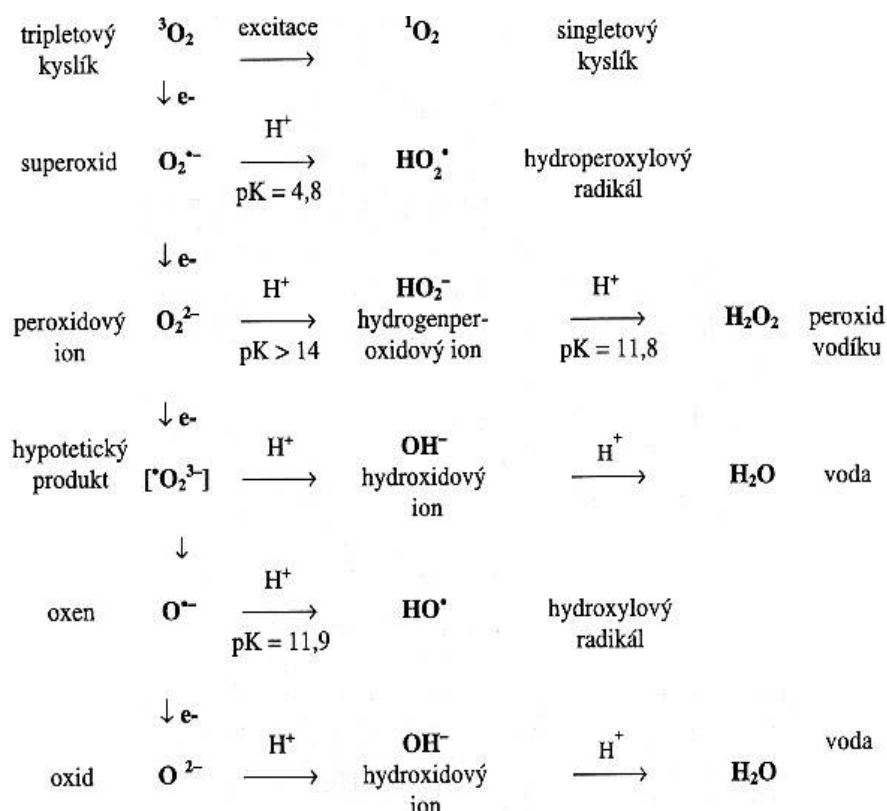
hlavní zasažené oblasti	Onemocnění
CNS, mozek	Parkinsonova choroba, amyotrofická laterální skleróza
srdce , cévy	infarkt myokardu, ateroskleróza
libovolné	rakovina
červené krvinky	malárie
pľíce	některé formy akutního syndromu dechové tísně ARDS
slinivka	zánět slinivky břišní (pankreatitida)
klouby	revmatoidní artritida
ledviny	nefrotický syndrom
oči	šedý zákal

Oxiдаční stres je také významným faktorem podílejícím se na procesech stárnutí a nemocech s nimi spojených.⁵⁴

2.3.3 Vznik volných radikálů v lidském organismu

2.3.3.1 Vznik na základě endogenních příčin

Volné radikály se v těle uvolňují při mnoha metabolických pochodech, často s účastí enzymů. Jejich významným producentem jsou zejména reakce probíhající v dýchacím řetězci mitochondrií, jež jsou nutné pro aerobní způsob života. Při postupné redukci kyslíku na vodu se tak tvoří celá řada volných radikálů. Schématický průběh je znázorněn na obrázku 2.7.



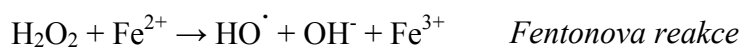
Obr. 2.7: Postupná redukce kyslíku na vodu probíhající v dýchacím řetězci mitochondrií⁵⁵

Dalšími interními místy vzniku ROS a RNS jsou například fagocyty, mikrosomy a peroxisomy⁵⁶. ROS a NOS jsou produkovány i při mnoha jiných procesech v organismu. Nejvýznamnější z nich jsou shrnuty v následující tabulce.

Tab 2.8: Produkce ROS a NOS při pochodech probíhajících v lidském organismu^{52, 56, 57, 58}

ROS, NOS	V z n i k v t ě l e
$O_2^{\bullet -}$	-únikem elektronu na kyslík: dýchací řetězec mitochondrií, redoxní systémy (mikrosomální cytochrom P450 monooxygenasa) -za účasti NAD(P)H oxidasy ve fagocytech -pomocí enzymů:cyklooxygenasy, xanthinoxidasy, lipoxygenasy -reakcí Fe^{2+} hemoglobinu s kyslíkem -autooxidací askorbátu, glutathionu, thiolů, catecholaminů -v kardiovaskulárním systému a dalších systémech
OH^{\bullet}	ionizační zářením (ionizací vody), Fentonovou reakcí, Haberovo-Weissovou reakcí
H_2O_2	dismutací superoxidu, činností enzymů (xanthinoxidasy, monoaminioxidasy)
NO^{\bullet}	reakcí L-argininu s O_2 a NADPH za účasti NO syntázy
$OOONO^{\bullet -}$	reakcí oxidu dusnatého se superoxidem
$HOCl$	oxidací chloridových iontů myeloperoxidasou za přítomnosti H_2O_2

Významnými reakcemi vzniku hydroxylových radikálů v organismu jsou Fentonova a Haberova-Weissova reakce (viz tab 2.4):^{52, 58}



Vznikající HO^{\bullet} je vysoce reaktivní a poškozuje molekuly kolem místa svého vzniku. Lze jej bezpečně zneškodnit enzymy glutathionperoxidasou a katalázou.⁵²

Nadměrná tvorba reaktivních forem může být způsobena i vlivem různých onemocnění a zánětlivých procesů probíhajících v těle.⁵⁶

2.3.3.2 Vznik na základě externích vlivů^{56, 59}

Zvýšená produkce ROS A RNS v organismu může být vyvolána běžnými okolními vlivy prostředí či osvojenými návyky. Patří mezi ně:

- ionizující záření
- expozice ozónu
- škodliviny z ovzduší a kontaminovaného prostředí
- kouření
- nadměrná fyzická námaha
- nevhodná výživa
- některé léky a toxické látky

2.3.4 Pozitivní účinky volných radikálů

Volné radikály nemají pouze negativní dopad. V omezeném množství jsou potřebné pro zachování některých důležitých biologických funkcí, jsou produkovány a využívány v konkrétních metabolických pochodech.

S jejich produkcí a tvorbou jsou spjaty následující procesy: Jejich přínosem je:⁵⁷

- generace ATP z ADP oxidativní fosforylací v mitochondriích
- detoxifikace xenobiotik cytochromem P450
- apoptosa nefunkčních nebo poškozených buněk
- likvidace mikroorganismů a rakovinných buněk makrofágy a cytotoxickými lymfocyty
- tvorba prostaglandinů a leukotrienů, které mají mnoho regulačních funkcí (například při zánětlivých procesech)

2.4 Antioxidanty

2.4.1 Charakteristika antioxidantů

Antioxidanty jsou látky schopné zabránit nebo částečně zamezit oxidativním přeměnám jiných látek. Za počátky jejich užití lze považovat padesátá léta 19.století, kdy

byly použity pro zpomalení oxidace lipidů.⁶⁰ Později začaly být aplikovány zejména v oblastech průmyslové výroby (jako antikorozivní prevence) či v potravinářství pro konzervování potravin a přechovávání snadno degradovatelných látek.⁶¹

V současné době jsou prezentovány nejen jako látky s širokým uplatněním v chemickém, potravinářském a kosmetickém průmyslu, ale zejména jako likvidátory škodlivých volných radikálů uvolňujících se při některých oxidativních procesech v lidském organismu. Antioxidanty mohou vznik radikálů eliminovat nebo omezit jejich aktivitu, a to tak, že je převedou do méně reaktivních nebo nereaktivních stavů.^{62,63}

Antioxidanty mohou být syntetizovány jako zcela specifické sloučeniny či jako látky identické nebo částečně identické s antioxidanty vyskytujícími se běžně v přírodě.^{64, 65, 66, 67} V posledních letech jsou vyzdvihovány účinky přírodních antioxidantů, trendem je jejich užití v kosmetickém a potravinářském průmyslu.⁶⁸ V souvislosti s jejich širokým spektrem léčebných účinků jsou stále předmětem diskusí mnoha vědeckých prací.

2.4.2 Antioxidanty přijímané potravou

2.4.2.1 Vitamín C

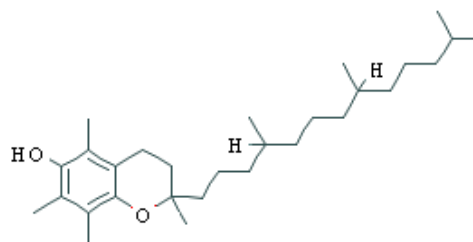
Známý, ve vodě rozpustný vitamín s nezastupitelnou úlohou v živých organismech a významnou antioxidační aktivitou. Jako donor elektronu se účastní redoxních reakcí, při kterých dochází k redukci či neutralizaci ROS a RNS jako je $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , ROO^{\cdot} , NO^{\cdot} .⁶⁹ Bylo zjištěno, že u jedinců vystavených oxidačnímu stresu vlivem volných radikálů byl obsah vitamínu C v krvi menší než 45 $\mu\text{mol/l}$, zatímco u zdravých jedinců v rozmezí 61-80 $\mu\text{mol/l}$.⁷⁰ V rostlinách je substrátem pro enzym askorbát peroxidázu, jejíž funkcí je redukovat nežádoucí peroxid vodíku, vznikající jako vedlejší produkt metabolismu, na vodu. Celý proces je součástí glutathion-askorbátového cyklu.^{71, 72}

Spektrum zdravotních účinků podmíněných antioxidačními schopnostmi vitamínu C je velmi široké. Je spojován s léčbou zápalu plic,^{73, 74} vysokého krevního tlaku,⁷⁵ či prevencí cévních chorob a mozkové mrtvice.^{76, 77} Jako donor elektronu se podílí na mechanismu hydroxylace aminokyselin nutných pro syntézu kolagenu a tím předchází vzniku kurdějí.^{78, 79} Existují však i studie poukazující na nedostatečně průkazné účinky při léčbě některých nemocí^{80, 81, 82} či na možný vznik některých drobných komplikací při užívání tohoto vitamínu.⁸³ Největší množství vitamínu C (od 1200 mg/100 g) obsahují

plody kakadu plum rostoucí na stromech v severní Austrálii.^{84, 85} V ovoci nám dostupném lze nejvíce vitamínu C najít v černém rybízu (150 - 230 mg/100 g) a kiwi (60 - 90 mg/100 g), citron obsahuje asi 50 - 60 mg/100 g.^{86, 87} V hojném zastoupení je zejména v chloroplastech.⁸⁸

2.4.2.2 Tokoferoly

V tučných rozpustných vitamínech zahrnují skupinu osmi isomerních molekul, které jsou tvořeny chromanovým kruhem a postranním hydrofobním izoprenoidním řetězcem.⁸⁹ Nejvyšší biologickou aktivitu z nich má vitamín E (α -tokoferol) a je to i nejhojněji přirozeně se v přírodě vyskytující forma⁹¹



Obr.2.8: *Struktura α -tokoferolu*

Za jednu z hlavních funkcí α -tokoferolu je považována jeho schopnost chránit membrány před oxidací reakcí s peroxylovými radikály, produkovanými při řetězových reakcích peroxidace lipidů.^{89, 90, 91}

Vzniklé α -tokoferolové radikály jsou následně přeměněny zpět na α -tokoferol reakcí s dalšími antioxidanty, jako je vitamín C, ubiquinol nebo retinol.⁸⁹

Tokoferoly reagují s mnoha reaktivními formami kyslíku a dusíku, například $O_2^{\cdot-}$, $OONO$, RO^{\cdot} , NO_2^{\cdot} , O_3 . Vůči RNS je údajně efektivnějším antioxidantem γ -tokoferol.⁸⁹

Již dlouho se předpokládá, že díky antioxidačním schopnostem vitamínu E může jeho podávání předcházet vzniku řady cévních onemocnění a rakoviny.^{92, 93, 94} Mnohé studie posledních let však hovoří o žádném⁹⁵ nebo ještě častěji o velmi škodlivém účinku při podávání vitamínu E jako doplňku stravy.^{96, 97, 98}

Vitamín E je ve větší míře obsažen zejména v oleji z obilných klíčků, rostlinných olejích a ořeších.^{99, 100}

2.4.2.3 Karotenoidy

Široká skupina více než 600 přírodních barviv, vykazujících antioxidační aktivitu. pouze několik je využitelných v lidském organismu^{101, 102}

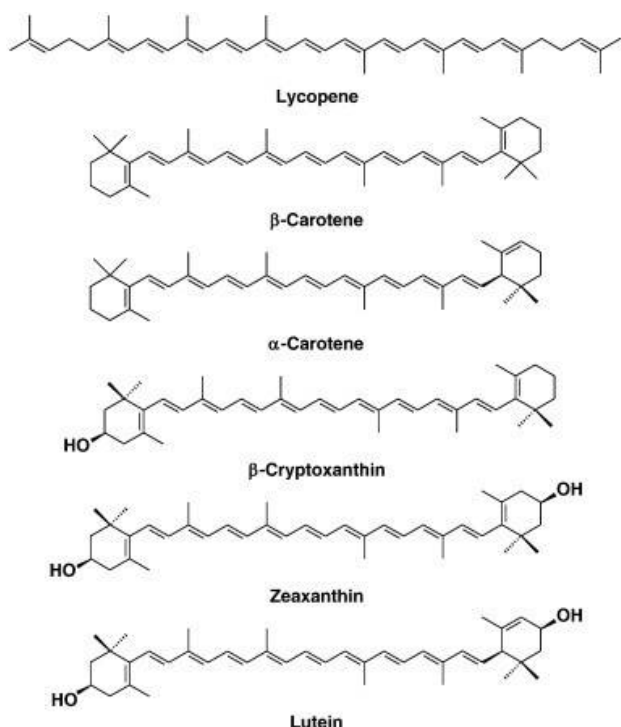
Mnoho jejich funkcí v lidském organismu není zatím úplně objasněno, proto jsou stále předmětem vědeckého bádání. Je však známo, že karotenoidy, zejména lykopen a

betakaroten, jsou velmi efektivními deaktivátory singletového kyslíku a peroxylových radikálů^{103, 104, 105, 106, 107} vznikajících při fotooxidaci a mají schopnost se akumulovat v pokožce.¹⁰³ Díky těmto vlastnostem pomáhají chránit pokožku před škodlivým UV zářením a známkami stárnutí.^{103, 107, 108} V řadě studií je karotenoidům připisován podíl na antioxidačním účinku některých potravin,^{109, 110, 111} v dalších je poukazováno na možné antikarcinogenní účinky,^{112, 113, 114} v jiných na to, že výsledky jsou sporné.¹¹⁵ Objevují se i odborné články spojující užívání potravinových doplňků s vyšším obsahem beta-karotenu se zvýšeným výskytem rakoviny a úmrtnosti zejména u kuřáků a pracovníků vystaveným kontaktu s azbestem.^{116, 117, 118}

Tab 2.9: Nejznámější karotenoidy využitelné v organismu^{119, 120, 121, 122, 123}

zástupci	zástupci	dodané zbarvení	potraviny s vysokým obsahem
karoteny (bezokyslíkaté)	α-karoten	oranžové	dýně, mrkvová šťáva, vařená mrkev
	β-karoten	oranžové	mrkvová šťáva, dýně, špenát, sušené broskve
	lykopen ψ, ψ -carotene	červené	rajčatová pasta, pyré a šťáva, vodní meloun
xanthophyly (obsahují kyslík)	lutein β, ϵ -carotene-3,3'-diol	žluté	špenát, kapusta, žloutky
	zeaxanthin β, β -carotene-3,3'-diol	žluté	špenát, kapusta, žloutky
	β-kryptoxanthin (3R)- β, β -Caroten-3-ol	oranžové	dýně, papája, mandarinky, pomeranče

Pouze lutein a zeaxanthin byly nalezeny v lidském oku, kde filtrují nežádoucí



vysokoenergetické modré světlo a chrání proti vzniku ROS a volných radikálů. Stejně tak byla jejich přítomnost prokázána v pokožce, kde sehrávají podobnou ochrannou funkci jako již výše zmíněný lykopen a betakaroten.¹²⁴

Lykopen je velkým zdrojem inspirace vědeckého výzkumu i díky svým možným antikarcinogenním vlastnostem,¹¹⁹ β-karoten, stejně jako karoten a β-kryptoxantin, je provitaminem vitamínu A.¹¹⁹

Obr. 2.9: *Struktury karotenoidů*¹²⁵

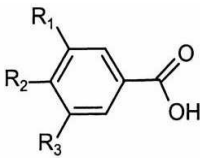
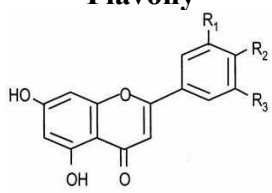
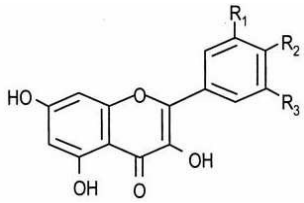
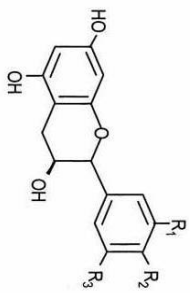
2.4.2.4 Polyfenoly

Velmi rozsáhlá skupina přírodních látek s antioxidačními účinky, je známo více než 8000 polyfenolických sloučenin.¹²⁶ Rozdělení polyfenolů je znázorněno v tabulce 2.10.

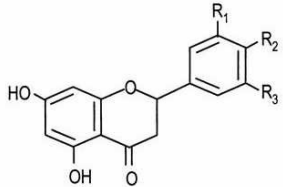
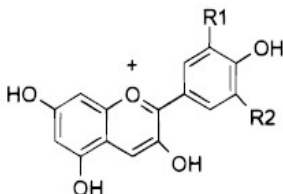
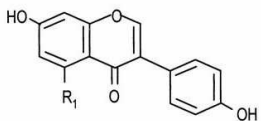
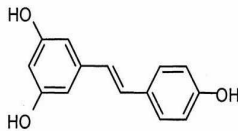
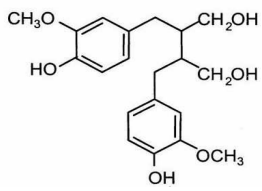
Tab 2.10: *Nejběžnější zástupci polyfenolů, jejich základní struktury a výskyt*^{127, 128, 129, 130, 131, 132}

Polyfenoly	Zástupci	Zástupci	Výskyt
Fenolové kyseliny	Hydroxyskořicové kyseliny 	kyselina kávová chlorogenová	Káva, borůvky, kiwi, třešně, jablka
		kyselina ferulová	pšenice, rýže, cereálie, lilek

Tab 2.10: *Nejběžnější zástupci polyfenolů, jejich základní struktury a výskyt, pokračování*
127, 128, 129, 130, 131, 132

Polyfenoly	Zástupci		Výskyt
Fenolové kyseliny	Hydroxybenzoové kyseliny 	gallová	maliny, jahody, ostružiny, čaj ořechy, černý rybíz, cibule
		ellagová	maliny, jahody, ostružiny, ořechy, cibule
Flavonoidy	Flavony 	apigenin luteolin	celer, petržel, červená paprika
		nobiletin sinensetin tangeretin	citrusové plody
	Flavanoly 	kvercetin kemferol	česnek, cibule, pór, jablka, čaj, brokolice, borůvky, červené víno
		myricetin	bobule, kukuřice, čaj
		isorhamnetin	cibule, hrušky
		rutin	pohanka
	Flavanoly 	katechiny	katechin epikatechin gallokatechin epigallokatechin epigallokatechin-3-gallát
		Proanthokyanidiny	bílý čaj, zelený čaj, kakaové boby, červené víno, černý čaj
			jablka, hrušky, hrozny, červené víno, čaj, pivo, kakaové boby

Tab 2.10: *Nejběžnější zástupci polyfenolů, jejich základní struktury a výskyt, pokračování*^{127, 128, 129, 130, 131, 132}

Polyfenoly	Zástupci	Zástupci	Výskyt
Flavonoidy	Flavanony 	hesperetin	pomeranče
		naringenin	grepy
		eriodictyol	citróny
	Anthokyanidiny 	kyanidin pelargonidin peonidin delfinidin petunidin malvidin	třešně, švestky, černý rybíz, maliny, ostružiny, jahody, borůvky, modré bobule hroznového vína, víno, pivo, červené zelí, cibule, fazole
	Isoflavonoidy (fytoestrogeny) 	daidzein genistein glycitein	sója, luštěniny
	resveratrol 		červené víno, modré hroznové víno (slupky)
Lignany	sekoisolariciresinol 		lněné semínko, lněný olej, celá zrna

Polyfenoly jsou zodpověděny za zabarvení, hořkost a svíravé účinky některých potravin.^{127, 133} O jejich antioxidačních účincích bylo publikováno mnoho vědeckých prací. Pozornost je soustředěna především na jejich využití při léčbě kardiovaskulární chorob a rakoviny¹²⁷ i na jejich schopnosti předcházet těmto onemocněním.¹³⁴ Jsou spojovány s prevencí vzniku oxidačního stresu a s ním souvisejících projevů stárnutí.¹³⁵

Z výše uvedené tabulky je zřejmé, že největší množství polyfenolů lze nalézt v čaji, vínu, pivu, kávě, čokoládě s vysokým obsahem kaka, barevném ovoci a některých druzích zeleniny.

Významnými zástupci jsou zejména katechin **epigalokatechin-3-gallát (EGCG)** a stilben **resveratrol**. Epigalokatechin-3-gallát je ve větší míře obsažen v zeleném a bílém čaji a pro své antikarcinogenní účinky je v popředí zájmu mnoha vědeckých výzkumů.¹³⁶ Podobně je tomu i u resveratrolu.¹³⁷ Mimo jiné mohou obě látky sloužit jako ochranné faktory před vznikem škodlivého peroxidu, oxidů dusíku a ROS způsobeným dopadem UV záření na lidskou pokožku.^{134, 138}

Mnohé vědecké studie poukazují na nízkou biologickou dostupnost některých polyfenolů, zejména proanthokyanidinů, gallokatechinů a anthokyanů.¹³⁹ Polemizuje se i o tom, že mnohé účinky mohou být vyvolány jinými substancemi vyskytujícími se společně s polyfenoly, zejména se může jednat o nárůst antioxidační aktivity díky fruktózou indukované syntéze kyseliny močové.^{140, 141}

2.4.2.5 Mikroelementy a stopové prvky

2.4.2.5.1 Selen^{142, 143}

Selen je součástí antioxidačních enzymů, jako je glutathion peroxidasa a thioredoxin reduktasa, pro jejichž syntézu je potřeba aminokyselina selenocystein. Antioxidační a protinádorová aktivita byla zjištěna i u některých nízkomolekulárních a organických sloučenin selenu. Mechanismy účinku však ještě nebyly v mnoha případech zcela objasněny.

2.4.2.5.2 Zinek¹⁴⁴

U tohoto prvku bylo zjištěno mnoho funkcí spojených s jeho antioxidační aktivitou. Zinek a enzymy obsahující zinek jsou schopny chránit specifické části enzymů před napadením volnými radikály a zajišťovat tak jejich stabilitu a aktivitu. Pokud je zinek zakomponován do proteinů namísto železa nebo mědi, je zabráněno reakcím vedoucím ke

vzniku volných radikálů, jaké by se mohly jinak vyskytnout. Podílí se na antioxidační ochraně mozku a CNS, významné množství zinku je obsaženo právě v mozku. Může tak významně přispívat k prevenci vzniku onemocnění jako je Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba. Značná pozornost je věnována i možné spojitosti antioxidačních funkcí zinku s ochranou hematoencefalické *bariéry* (tzv. BBB, *blood-brain barrier*) před oxidačním poškozením.

2.4.3 Antioxidanty v lidském organismu

Řada významných antioxidantů je součástí lidského organismu, kde se přímo podílí na antioxidační ochraně buněk. Jejich přehled a funkce jsou shrnuty v následující tabulce.

Tab 2.11: *Biologické antioxidanty a jejich funkce při antioxidační ochraně buněk*

antioxidant	Funkce
superoxiddismutáza (SOD) ¹⁴⁵ (enzym)	•katalýza přeměny vysoce reaktivního $O_2^{\bullet-}$ na O_2 a méně reaktivní druhy H_2O_2
glutathionperoxidáza, (GSHPx) ¹⁴⁵ (enzym)	•katalýza redukce peroxidů vodíku za účasti glutathionu
kataláza (CAT) ¹⁴⁵ (enzym)	•katalýza přeměny H_2O_2 na H_2O a O_2
glutathion (GSH) ¹⁴⁶ (thiol)	•zdroj elektronů pro reakci katalyzovanou GSHPx, brání oxidaci proteinů
albumin ^{147, 148} (plazmatická bílkovina)	•eliminace $HClO$, snížení peroxidázové a katalázové aktivity vyvázáním hemu
ceruloplazmin ¹⁴⁷	•eliminace $HClO$, reakce s $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2
hemopexin ¹⁴⁸ (plazmatické bílkoviny)	•snížení peroxidázové a katalázové aktivity vyvázáním hemu
haptoglobin ¹⁴⁹ (plazmatická bílkovina)	•podíl na inhibici peroxidace lipidů vazbou na hemoglobin
transferrin ¹⁴⁹ (plazmatické bílkovina)	•podíl na inhibici peroxidace lipidů vazbou na volné atomy železa

Tab 2.11: *Biologické antioxidanty a jejich funkce při antioxidační ochraně buněk*
pokračování

antioxidant	funkce
kyselina močová ¹⁵⁰ (purinový derivát)	•reakce s $O_2^{\bullet-}$ a hydroxylovými radikály za současné přeměny kyseliny močové na allantoin
bilirubin ^{151, 152} (tetrapyrolový derivát, žlučové barvivo)	•reakce s $O_2^{\bullet-}$ a peroxylovými radikály za současné oxidace bilirubinu na biliverdin, brání peroxidaci lipidů
ubichinol (koenzym Q) ¹⁵³ (koenzym)	•eliminace peroxylových radikálů, brání peroxidaci lipidů a oxidaci bílkovin
kyselina lipoová ¹⁵⁴ (koenzym)	•vychytávání OH^{\bullet} , $HClO$, 1O_2
estrogeny ¹⁵⁵ estron, estriol, estradiol (hormony)	•brání peroxidaci lipidů a oxidativním poškozením DNA a proteinů, OH^{\bullet} odbourávány v antioxidačním cyklu estrogenů s chinoly jako meziprodukty
melatonin ¹⁵⁶ (derivát indolu)	•likvidace OH^{\bullet} , RO_2^{\bullet} , 1O_2 , $ONOO^-$, NO^{\bullet} , brání peroxidaci lipidů a degradaci DNA, zvyšuje produkci glutathionu

2.4.4 Celková antioxidační kapacita a její stanovení¹⁵⁷

2.4.4.1 Celková antioxidační kapacita

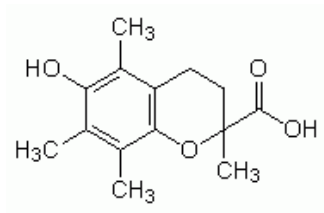
Pro stanovení antioxidační kapacity jsou využívány různé metody založené na eliminaci volných radikálů. Pojem celková antioxidační kapacita TAC - Total Antioxidant Capacity (lze najít též jako TAA - Total Antioxidant Activity) byl zaveden pro účely zjišťování TAC vzorků obsahujících více substancí s antioxidačními účinky. Měření TAC umožňuje získat výsledek o sledovaném materiálu jako celku, čehož lze využít při porovnávání antioxidačních schopností různých přírodních látek.

2.4.4.2 Stanovení celkové antioxidační kapacity metodami TEAC a VCEAC

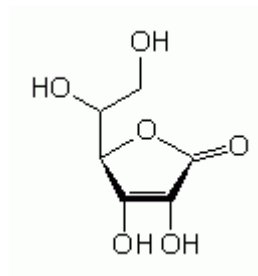
Ohledně stanovení TAC různých materiálů lze najít řadu postupů i použitých standardních látek. Velmi oblíbená je metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), využívající jako srovnávací standard pro stanovení TAC derivát vitamínu E - Trolox. Poprvé byla validována v roce 1993 v souvislosti s nově vyvinutou metodou pro měření TAC tělních tekutin (plazmy) a roztoků léků, založenou na absorbanci radikálů ABTS+. ^{158, 159} Ve spojitosti s těmito radikály je hojně aplikována.

Trolox je silnějším antioxidantem než α -tokoferol.¹⁶⁰ Dobře se rozpouští v methanolu a ethanolu, je však téměř nerozpustný ve vodě.¹⁶⁰ Uvedená organická rozpouštědla však nemusí být vhodná pro všechna stanovení TAC.

Pro stanovení vyžadující vodné prostředí lze jako standard použít kyselinu L-askorbovou. Výhodou oproti Troloxu je právě její dobrá rozpustnost ve vodě, je proto velmi užívaným standardem.^{161, 162} TAC stanovované látky je pak vyjádřena jako VCEAC (Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity),¹⁶³ tedy jako antioxidační kapacita ekvivalentní antioxidační kapacitě vitamínu C.



Obr. 2.10: *Struktura Troloxu*



Obr. 2.11: *Struktura kyseliny L-askorbové*

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje a vybavení

- Vlákenný spektrofotometr QE65000 řízený softwarem SpectraSuite, Ocean Optics, USA
- Průtoková kyveta FIA Z SMA 10 mm ULT, Ocean Optics, USA
- Křemenná průtoková cela pro fluorescenci (typ 583.4F/Q/10/Z15 (440 µl)), Starna (UK)
- Šesticestný nízkotlaký dávkovací ventil 5125, Rheodyne, USA
- Programovatelná peristaltická pumpa Masterflex, Cole Parmer, USA s osmikanálovou hlavou, Ismatec, Švýcarsko,
- Programovatelná peristaltická pumpa se čtyřkanálovou hlavou, Ismatec, Švýcarsko
- Tygonové hadičky o průměrech 1,14 mm, 1,6 mm a 2,06 mm
- Multifunkční kuchyňský robot Kitchen King 4 v 1, TV Products, Praha, Česká republika
- Filtrační papír s modrým pruhem pro filtraci roztoku luminolu
- Filtrační papír s červeným pruhem pro filtraci reálných vzorků

3.2 Použité chemikálie

- 3-aminophthalhydrazide; Luminol, $M_r = 177,16$; čistota 97%; Sigma – Aldrich, USA
- Na_2CO_3 bezvodý, čistota p.a.; $M_r = 105,99$; Lachema Brno
- NaHCO_3 ; čistota p.a., $M_r = 84,01$; Lachema Brno
- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$; čistota p.a., Lachema Brno
- CuSO_4 bezvodý, čistota p.a.; $M_r = 159,6$; Biogema VD Košice
- NaOH , čistota p.a.; $M_r = 39,99$; Lachema Brno
- H_2O_2 30%, čistota p.a.; $M_r = 34,01$; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina, Trolox; $M_r = 250,3$; Calbiochem, USA
- Ethanol pro spektroskopii; čistota 99,9%; $M_r = 46,07$, Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- Deionizovaná voda produkovaná zařízením Mili QPLUS; Milipore; USA
- Kyselina L-askorbová, čistota p.a.; $M_r = 176,12$, Sigma-Aldrich, USA

3.3 Použité vzorky s antioxidačními účinky

3.3.1 Vzorky s přírodními antioxidanty

3.3.1.1 Čokolády

- **Hořká čokoláda CARLA-CZECH CHOCO, kakaová sušina 70%**

Carla spol. s r.o., Dvůr Králové nad Labem, Česká republika

- **Mléčná čokoláda CARLA-CZECH CHOCO, kakaová sušina 30%**

Carla spol. s r.o., Dvůr Králové nad Labem, Česká republika

- **Čokoláda Belgian dark 85%, kakaová sušina 85%**

The Belgian Chocolate Group nv, Geelseweg, Belgie

3.3.1.2 Čaje

- **Pure White Tea, bílý čaj 100%; London Fruit & Herb Company; vyrobeno v EU**

- **Bílý čaj WHITE TEA, bílý čaj 100%; Teekanne, vyrobeno v EU**

- **Zelený čaj s příchutí manga a citrónu ZEN CHAI, zelený čaj, aroma citronu a manga; Teekanne, vyrobeno v EU**

- **Zelený čaj GREEN TEA, zelený čaj 100%; Teekanne, vyrobeno v EU**

- **Jemča ZELENÝ ČAJ, zelený čaj 100%; Tata Global Beverages, Jemnice, Česká republika**

- **Černý čaj YELLOW LABEL, černý čaj 100%; Lipton Tea Company, Unilever Warszawa, Polsko**

- **Zelený čaj SAYONARA, sypaný zelený čaj (mletý); Phoenix Monopol s.r.o. Praha, Česká republika**

- **GUNPOWDER Green Tea, sypaný zelený čaj; Twinings of London, Twinings and Company Limited, London, Velká Británie**

- **Earl Grey Tea, sypaný černý čaj, aroma bergamotu; Twinings of London, Twinings and Company Limited, London, Velká Británie**

- **Himalájský ajurvédský čaj JAIPHAL, Everest Ayurveda Antioxidant Tea, bylinná sypaná směs; Everest Ayurveda Ltd., Nepál**

3.3.1.3 Kávy

- **Nescafe Classic**, pražená rozpustná káva 100%; **Nestle**, Praha, Česká republika
- **Nescafe Green Blend**, rozpustná 100% káva – sušená směs pražené a zelené kávy; **Nestle**, Praha, Česká republika
- **Marila Tradiční Standard mletý**, pražená mletá káva 100%; **Mokate**, Praha, Česká republika

3.3.1.4 Vína

- **FRANKOVKA**; vinařská oblast Dobrogeu Rosu, Rumunsko
- **FRANKOVKA, Chateau Valtice**; červené víno, Vinné sklepy Valtice a.s., Valtice, Česká republika

3.3.1.5 Piva

- **GAMBRINUS**, světlý ležák, obsah alkoholu 5,0 % obj.; **Gambrinus Plzeň**, Česká republika
- **Pilsner Urquel**, světlý ležák, obsah alkoholu 4,4 % obj.; **Plzeňský Prazdroj, a.s.**, Plzeň, Česká republika
- **Velkopopovický Kozel černý**, tmavé výčepní pivo, obsah alkoholu 3,8 % obj.; pivovar **Velké Popovice**, Velké Popovice, Česká republika

3.3.1.6 Čerstvé šťávy

- Čerstvě vymačkaná citrónová šťáva
- Čerstvě vymačkaná šťáva z kiwi

3.3.2 Vzorky se syntetickými antioxidanty

- **Celaskon; Zentiva k.s.**, Dolní Měcholupy, Česká republika
antioxidanty obsažené v 1 tabletě: *vitamín C 100 mg*
- **Antioxidant; Walmark**, Třinec, Česká republika, 30 tablet
antioxidanty obsažené v 1 tabletě: *vitamin A 750 µg, vitamin C 50 mg, vitamin E 16,8 mg, selen 25 µg*

• **GS Vitamín E, selen a zinek; Green-Swan Pharmaceuticals CR, a.s., Praha, Česká republika**, 60 kapslí

antioxidanty obsažené v 1 tabletě: *vitamin E 67 mg, selen 50 µg, zinek 15 mg*

• **Selen +Zinek; Harmony Line, Alfa Vita, Praha, Česká republika**, 30 tablet

antioxidanty obsažené v 1 tabletě: *zinek 5 mg, selen 30 µg*

• **Selen 100 µg; Walmark, Třinec, Česká republika**, 30 tablet

antioxidanty obsažené v 1 tabletě: *selen 100 µg*

• **Bioaktivní Selen+Zinek; Pharma Nord ApS, Vojens, Dánsko**, 60+30 tablet

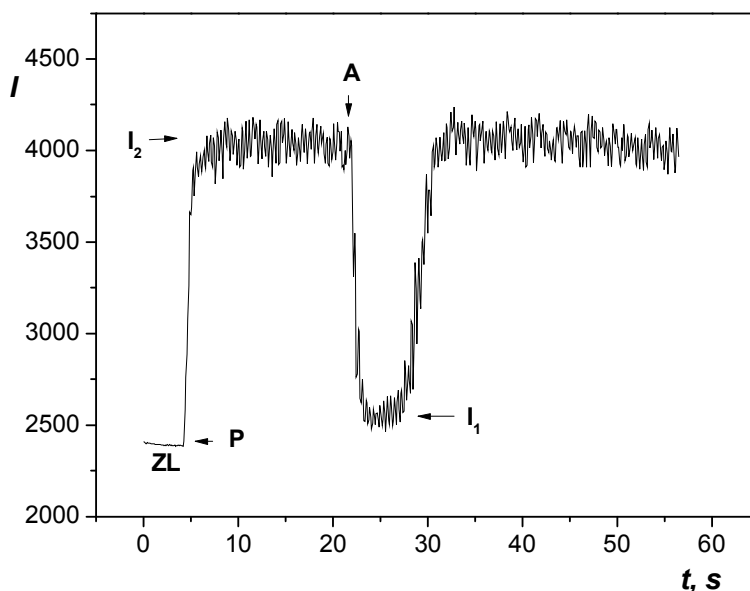
antioxidanty obsažené v 1 tabletě: *vitamín C 60mg, vitamin E 10 mg, vitamin B6 2 mg, betakaroten 6mg, zinek 15mg, selen 50µg*

4 VÝSLEDKY MĚŘENÍ

Jak již bylo řečeno v úvodu, cílem diplomové práce bylo vypracovat jednoduchou a rychlou průtokovou metodu pro stanovení celkové antioxidační aktivity přírodních i syntetických antioxidantů v potravinách a potravinových doplňcích. Práce vychází z předchozí bakalářské práce, kde bylo vypracováno dávkové chemiluminiscenční stanovení celkové antioxidační aktivity. Dávkové stanovení bylo sice citlivé, ale rychlost analýzy byla velice malá, v průběhu analýzy docházelo ke změnám experimentálních podmínek.

4.1 Princip průtokové chemiluminiscenční metody stanovení celkové antioxidační capacity TAC

Do Fia aparatury (Obr. 4.2) jsou v kontinuálním průtoku odděleně přiváděny 2 roztoky, roztok luminolu v bazickém prostředí a roztok peroxidu vodíku. Jakmile dojde ke kontaktu těchto dvou roztoků, je oxidací luminolu uvolněno chemiluminiscenční záření, jehož intenzita I_2 je detegována spektrofotometrem. Tento proces lze na záznamu pozorovat jako vzestup intenzity ze základní linie na hladinu, jejíž intenzita odpovídá množství uvolněného záření (Obr. 4.1).

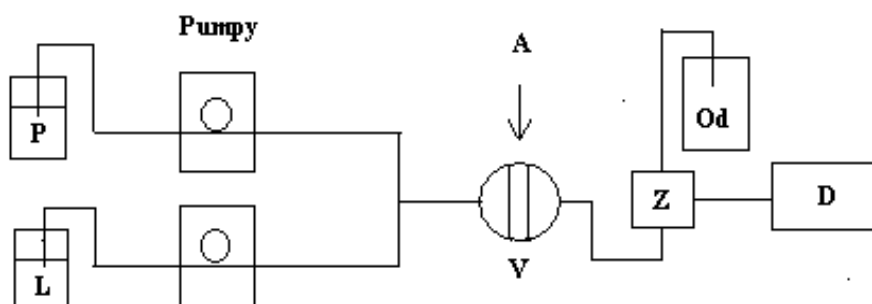


Obr.4.1: Ilustrativní záznam časové závislosti intenzity, znázorňující procesy probíhající při průchodu reagentů průtokovou kyvetou: ZL – základní linie intenzity, P – místo kontaktu peroxidu vodíku s luminolem, A – nadávkován roztok antioxidantu, I_2 – intenzita vybuzevané chemiluminiscence, I_1 – intenzita chemiluminiscence po přidání antioxidantu

Následně je dávkovací smyčkou nadávkován antioxidant. V důsledku procesů popsaných v pododdílu 2.2.2.2.3 je chemiluminiscence v přítomnosti antioxidantu zhášena a na záznamu je pozorován pokles intenzity signálu na hladinu intenzity I_1 , tento pokles je úměrný koncentraci nadávkováného antioxidantu. Rozdíl intenzit $I_2 - I_1$ je vyhodnocen. Celý proces je znázorněn na obrázku 4.1.

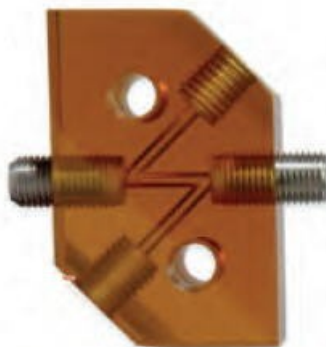
4.2 Měření s aparaturou FIA ve dvoukanálovém uspořádání

Pro měření TAC metodou FIA s chemiluminiscenční detekcí byla sestavena aparatura znázorněná na obrázku 4.2.



Obr.4.2: Schéma aparatury pro měření intenzity chemiluminiscence: *P* - roztok peroxidu vodíku, *L* - roztok luminolu, *Z* – zetová průtoková kyveta, *V* - šesticestný dávkovací ventil, *A* – antioxidant, *D* – spektrofotometrický detektor, *Od* – odpad

Jelikož doba trvání chemiluminiscence připraveného roztoku byla řádově několik sekund, bylo zapotřebí při sestavování měřicí průtokové aparatury přihlédnout k tomuto faktoru. Vzdálenost přívodů, kterými byl nasáván luminol a peroxid, a vzdálenost spoje mezi průtokovou kyvetou (obrázek 4.3) a detektorem musela být upravena tak (zkrácena), aby bylo možné pozorovat intenzivní chemiluminiscenci ještě i po průchodu reagentů kyvetou..



Obr.4.3: *Průtoková kyveta z chemicky odolného průhledného plastu „Ultem“ s možností připojení optických vláken*

4.2.1 Hledání vhodného složení chemiluminiscenčního roztoku

Prvním úkolem bylo nalézt vhodné složení reakční směsi. Požadavkem bylo dosažení stabilního průběhu chemické reakce v průtoku, které by vedlo k dosažení co nejvíce krátkodobě i dlouhodobě stabilního světelného toku. A tím i stabilní základní linie nosného proudu.

Do aparatury byly nejprve dávkovány stejné roztoky luminolu a peroxidu, jaké se ukázaly být optimální pro získání dostatečně intenzivního chemiluminiscenčního záření v bakalářské práci, tedy roztok 0,75% luminolu v 0,1M NaOH a roztok 25% peroxidu. Očekávalo se, že při kontaktu těchto dvou roztoků, tedy oxidaci roztoku luminolu peroxidem vodíku, bude uvolněno chemiluminiscenční záření, stejně jako tomu bylo při měření v mé bakalářské práci. Nebyl však zaznamenán téměř žádný signál.

Byly proto upravovány průtokové rychlosti i koncentrace jednotlivých reaktantů, ale ani po řadě optimalizačních úprav nebylo dosaženo významnějšího zlepšení, byl pozorován pouze velmi slabý luminiscenční signál probíhající v těsné blízkosti základní linie. Bylo tedy zřejmé, že použitá kombinace roztoků není vhodná pro průtoková měření s daným spektrofotometrem (byl použit jiný spektrofotometr, než při dávkové metodě.)

Další nabízenou možností bylo použít katalyzátor. Při měření bakalářské práce byla vyzkoušena dvojmocná měď, avšak výsledek nebyl příliš pozitivní. Reakce v přítomnosti již velmi nízkých koncentrací Cu^{2+} byla urychlena natolik, že po nadávkování peroxidu do roztoku luminolu bylo chemiluminiscenční záření uhašeno stejně rychle, jak prudce bylo uvolněno. Závislost tedy nabyla ostrého píku (přeměna na radikály byla velmi rychlá). Po nadávkování antioxidantu do takového uspořádání nebyla pozorovatelná žádná změna

závislosti signálu, neboť přeměna na radikály, doprovázená chemiluminiscencí, byla dokončena dříve, než mohlo k reakci s antioxidantem dojít.

V průtokové metodě, kde jsou reagenty kontinuálně přiváděny do systému a jsou tedy pro reakci neustále doplňovány, by mohl být průběh reakce jiný. Byl proto připraven zásobní roztok 0,1M CuSO_4 a jeho malé množství bylo zkusmo přidáno do roztoku 0,75% luminolu v 0,1M NaOH. Byla pozorována intenzivní chemiluminiscence. Do roztoku luminolu byly proto postupně přidávány různé objemy 0,1M roztoku CuSO_4 a byla proměřována jejich chemiluminiscenční spektra v průtokovém uspořádání podle obrázku 4.2. Na záznamu však byly pozorovány náhlé poklesy intenzity. Přidaná měď byla příčinou srážení roztoku po reakci s peroxidem vodíku a vzniklá sraženina se shromažďovala na dně průtokové kyvety firmy Starna. Odtud byla v různých množstvích částečně vymývána přitékajícím roztokem do zóny před detektor a byla tak příčinou opakovaného odstínění chemiluminiscenčního záření.

Proto bylo nutno přistoupit k určitým změnám. Průtoková kyveta firmy Starna byla nahrazena zetovou průtokovou kyvetou firmy OceanOptics, v níž se sraženina reakčního produktu neusazovala a veškerý přitékající objem byl unášen úzkým zetovým prostorem ven. Kyveta tak byla neustále samočištěna. Bylo však zapotřebí zabránit vzniku sraženiny během průchodu kyvetou, tedy nalézt takové složení reakčního roztoku, ve kterém by po oxidaci peroxidem vodíku nemohlo docházet ke srážení.

Inspirace byla nakonec získána z experimentů *Declana Fleminga z bristolské univerzity*¹⁶⁴ a experimentátora Ondřeje Šimůnka¹⁶⁵. Byl použit roztok luminolu v prostředí uhličitanového pufru (kombinace Na_2CO_3 , NaHCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) s přidavkem CuSO_4 . Po přikápnutí zředěného peroxidu vodíku do kádinky s tímto roztokem byla vybuzena intenzivní chemiluminiscence trvající několik sekund a vznik sraženiny nebyl pozorován ani po proběhnutí reakce. Bylo tedy zřejmé, že hledané složky roztoku byly nalezeny.

4.2.2 Optimalizace podmínek průtokového stanovení

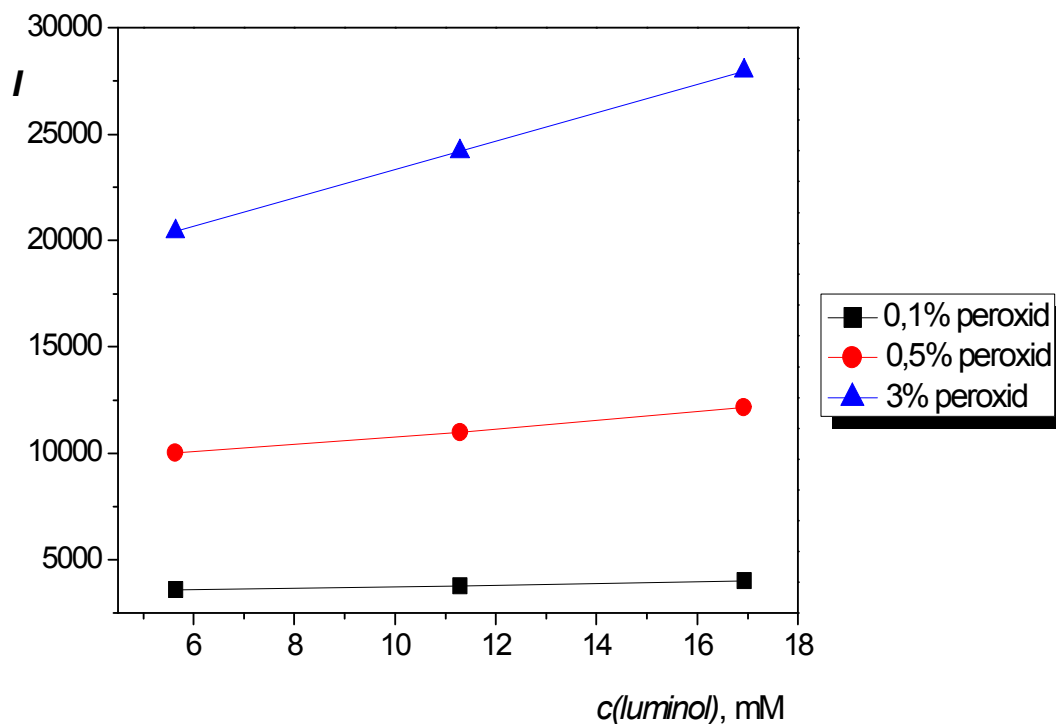
Nejprve bylo potřeba najít takové podmínky pro stanovení, aby bylo dosaženo maximální a zároveň stabilní intenzity chemiluminiscenčního záření po oxidaci roztoku luminolu zředěným peroxidem vodíku. Bylo nutné nalézt optimální hodnoty koncentrací látek podílejících se na chemiluminiscenční reakci luminolu, optimální pH a průtokové rychlosti jednotlivých reagentů.

4.2.2.1 Postup přípravy chemiluminiskujícího roztoku

Pro přípravu chemiluminiskujícího roztoku byly vždy použity stejné koncentrace uhličitanů, vytvářející ve výsledném roztoku pufr. Tento pufr byl obsažen v každém roztoku. Koncentrace luminolu a CuSO_4 byly měněny podle optimalizačních požadavků. Při přípravě 500 ml roztoku byly vždy nejprve rozmíchány 2 gramy uhličitanu sodného zhruba ve 300ml destilované vody a následně bylo přidáno konkrétní množství luminolu (pododdíl 4.2.2.3). Poté bylo přidáno 12 gramů hydrogenuhličitanu sodného, 25g uhličitanu amonného a nakonec specifické množství bezvodého síranu měďnatého (pododdíl 4.2.2.5). Roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku na objem 500ml. Další chemikálie byla do roztoku přidána až po úplném rozpuštění předchozí. Tento postup přípravy byl použit při přípravě všech roztoků. Důležité bylo dodržet pořadí přidavku luminolu, neboť jeho rozpustnost stoupá se vzrůstajícím pH roztoku i přesto nebyl luminol při takovémto postupu přípravy kompletně rozpuštěn a roztok bylo nutno přefiltrovat přes filtr s modrým pruhem. Tyto nedostatky byly později odstraněny při optimalizaci pH.

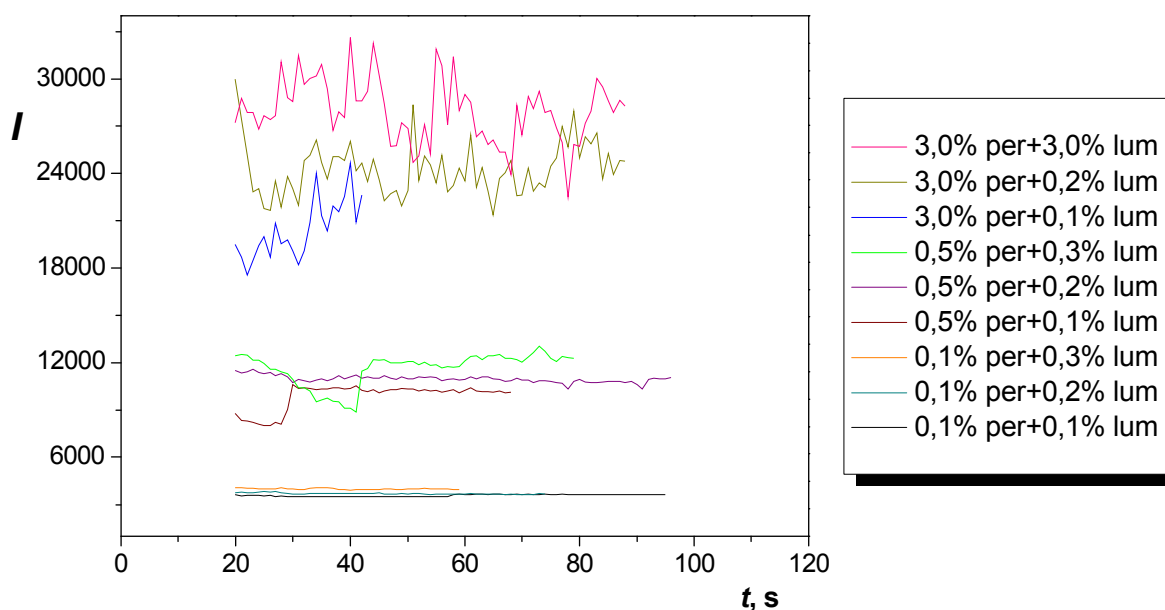
4.2.2.2 Stanovení optimálních koncentrací luminolu a peroxidu

Byly připraveny 3 chemiluminiscenční roztoky s koncentrací síranu měďnatého 25 mM a s koncentracemi luminolu 5,6 mM (0,1 g luminolu na 100 ml roztoku), 11,3 mM (0,2 g luminolu na 100 ml roztoku) a 16,9 mM (0,3 g luminolu na 100 ml roztoku). Dále byly připraveny 3 roztoky peroxidu vodíku o objemových procentuálních koncentracích 0,1 %, 0,5 % a 3 %. Roztoky luminolu byly do systému nasávány průtokovou rychlostí $7,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, roztoky peroxidu vodíku průtokovou rychlostí $2,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ (obrázek 4.2). Do systému byly postupně aplikovány všechny připravené roztoky luminolu a peroxidu ve vzájemných kombinacích. Naměřené hodnoty intenzity chemiluminiscenčního záření jsou zobrazeny na obrázku 4.4.



Obr.4.4: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na různě koncentrovaných roztocích luminolu při reakci s 0,1%, 0,5% a 3% peroxidem vodíku; $c(\text{CuSO}_4) = 25 \text{ mM}$, průtoková rychlost roztoků luminolu = $7,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, průtoková rychlost roztoků peroxidu vodíku = $2,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\text{pH} = 8,06$

Nejvyšší intenzity luminiscence bylo dosaženo při použití 16,9 mM luminolu v kombinaci s 3% peroxidem, ale signál byl v čase velmi nestabilní. Jako optimální byla nakonec vybrána kombinace 11,3 mM luminolu a 0,5% peroxidu, která poskytovala signál nižší, ale podstatně stabilnější. Na následujícím obrázku jsou porovnány časové záznamy (60 sekund) dosažených intenzit chemiluminiscence pro všechny použité kombinace koncentrací luminolu a peroxidu. S rostoucí koncentrací peroxidu vodíku byl pozorován nárůst intenzity, ale zároveň i velký nárůst nestability signálu. Jak z obrázku 4.5 vyplývá, byla největším problémem nestabilita signálu základní linie, která při vyšších koncentracích peroxidu zcela znemožňovala provádět měření



Obr.4.5: Časová závislost intenzity chemiluminiscenčního záření pro různé kombinace různě koncentrovaných roztoků peroxidu a luminolu; $c(\text{CuSO}_4) = 25 \text{ mM}$, průtoková rychlost roztoku luminolu $7,7 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, roztoku peroxidu vodíku $2,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\text{pH} = 8,06$

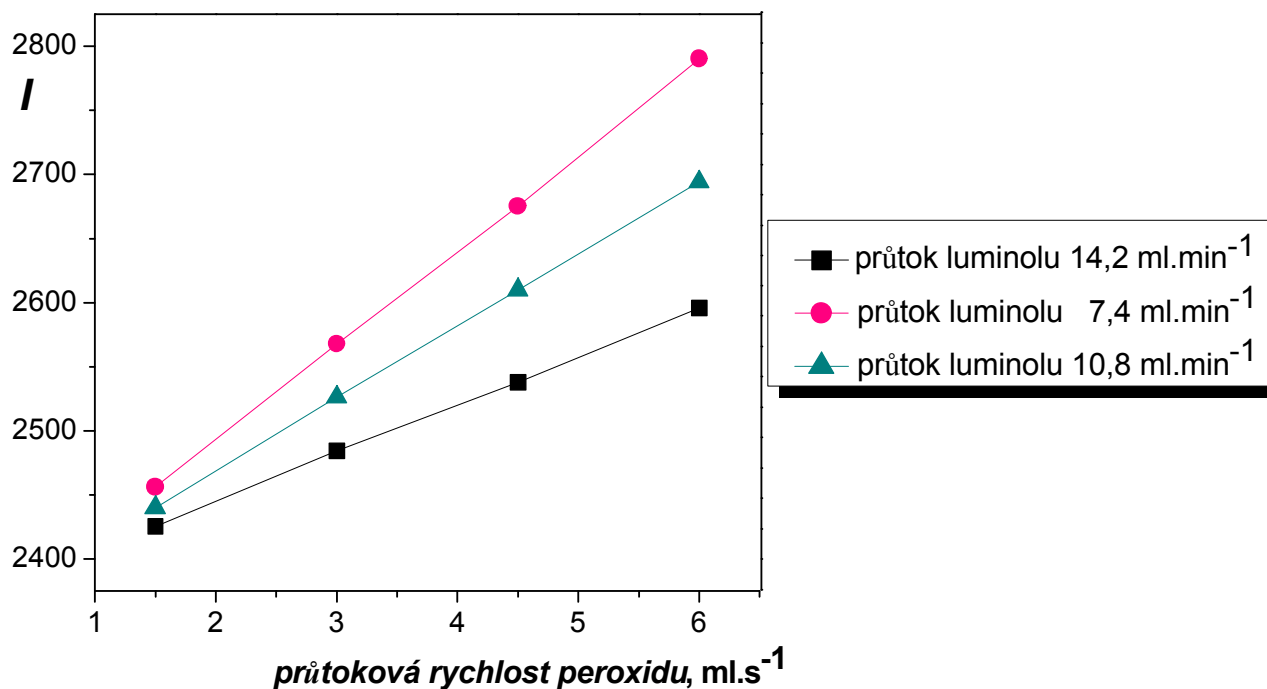
. Bylo proto nutné použít nižší koncentrace peroxidu i luminolu. Tímto opatřením byla sice výrazně snížena intenzita základní linie (a tedy i zhoršena budoucí citlivost stanovení), ale zároveň byl výrazně snížen šum základní linie (a tedy i zlepšena budoucí mez detekce stanovení). Dalšího snížení šumu základní linie bylo dosaženo změnou parametrů odečtu signálu na spektrometru – prodloužením integračního času.

4.2.2.3 Zjištění optimálních průtokových rychlostí luminolu a peroxidu

Pro přípravu chemiluminiscenčního roztoku byl tedy nakonec použit $11,3 \text{ mM}$ roztok luminolu a 25 mM síran měďnatý. Pro oxidaci pak optimální koncentrace peroxidu vodíku $0,5 \%$. V další části práce pak byly proměřeny kombinace průtokových rychlostí roztoku luminolu ($14,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $10,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a $7,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) a průtokových rychlostí peroxidu vodíku ($1,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $3,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $4,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a $6,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$).

Při nižších průtokových rychlostech roztoku luminolu v kombinaci s vyššími průtokovými rychlostmi peroxidu byla snížena stabilita intenzity vybuzevané chemiluminiscence. Nejintenzivnější a zároveň stabilní intenzity luminiscence bylo dosaženo

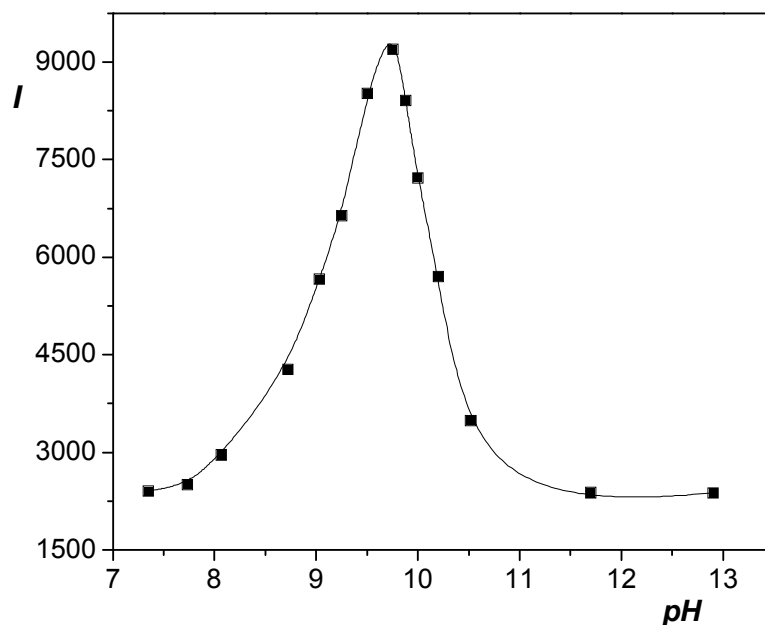
při průtokových rychlostech luminolu $7,4 \text{ ml.s}^{-1}$ a průtokové rychlosti peroxidu $6,0 \text{ ml.s}^{-1}$. Tyto průtokové rychlosti byly proto použity pro další měření



Obr.4.6: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na průtokových rychlostech 0,5% roztoku peroxidu vodíku při reakci s 11,3mM roztokem luminolu protékajícím rychlostmi $14,2 \text{ ml.min}^{-1}$, $10,8 \text{ ml.min}^{-1}$ a $7,4 \text{ ml.min}^{-1}$; $c(\text{CuSO}_4) = 25 \text{ mM}$, $\text{pH} = 8,06$

4.2.2.4 Stanovení optimálního pH

Bylo připraveno 14 roztoků s koncentrací luminolu 11,3 mM a síranu měďnatého 25 mM. V roztocích bylo upravováno výchozí pH 8,06 přidavky hydroxidu sodného (příprava roztoků s vyšším pH) a přidavky kyseliny chlorovodíkové (příprava roztoků s nižším pH). Při optimálních průtokových rychlostech byla proměřena spektra roztoků s hodnotami pH 7,35; 7,73; 8,07; 8,72; 9,03; 9,25; 9,5; 9,75; 9,88; 10,0; 10,2; 10,52; 11,7 a 12,9. Pro oxidaci roztoku luminolu byla použita optimální koncentrace peroxidu vodíku.

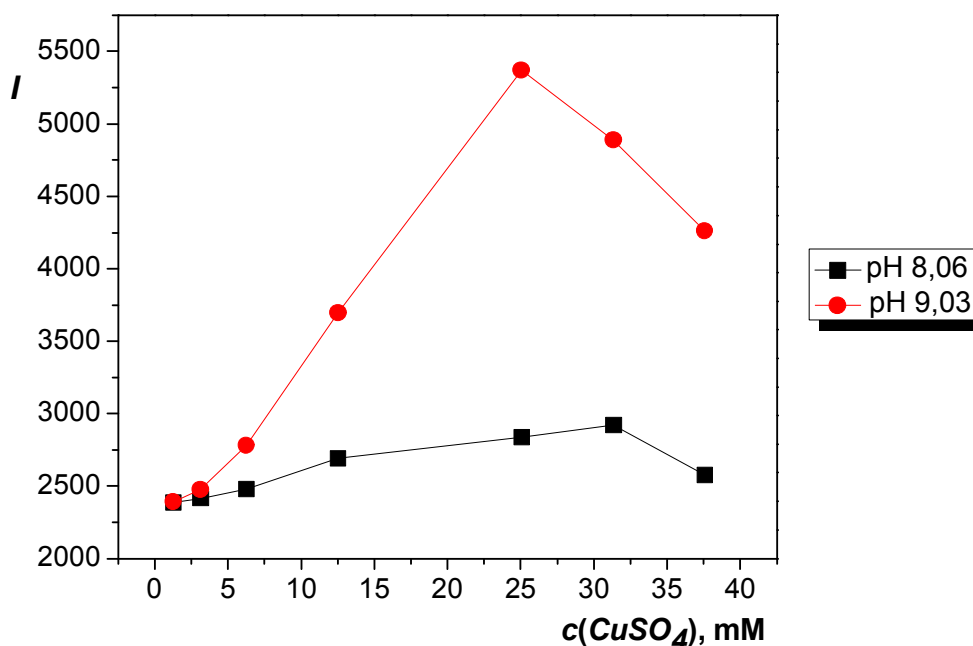


Obr.4.7: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na pH pro 11,3mM roztoky luminolu po reakci s 0,5% roztokem peroxidu vodíku; $c(\text{CuSO}_4) = 25 \text{ mM}$; průtokové rychlosti: roztok luminolu = $7,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, roztok peroxidu vodíku = $6,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Nejvyšší intenzity bylo dosaženo při pH 9,75, avšak při pH vyšším než 9,0 byl zaznamenaný signál v čase značně nestabilní. Jako optimální hodnota pH byla proto nakonec vybrána hodnota pH 9,0. Při dosažení pH 9,0 bylo navíc pozorováno, že došlo k rozpuštění veškerého luminolu použitého pro přípravu roztoku. Roztok se také stal dokonale průzračným a nebylo ho už zapotřebí filtrovat.

4.2.2.5 Stanovení optimální koncentrace CuSO_4

Pro porovnání byly připraveny dvě série sedmi roztoků. Hodnota pH první série byla ponechána bez úpravy na pH 8,06 (tyto roztoky bylo nutno přefiltrovat); pH druhé série bylo upraveno na pH 9,0. Ve všech roztocích byl obsažen 11,3 mM roztok luminolu, měněn byl pouze obsah síranu měďnatého. Výsledné koncentrace CuSO_4 v roztocích byly 1,25 mM, 3,13 mM, 6,27 mM, 12,53 mM, 25,06 mM, 31,33 mM a 37,59 mM. Na aparatuře byly nastaveny optimální průtokové rychlosti, pro oxidaci byla použita optimální koncentrace peroxidu vodíku.



Obr.4.8: Závislost intenzity chemiluminiscenčního záření na koncentraci Cu^{2+} v 11,3mM roztocích luminolu o pH 8,06 a pH 9,0 při reakci s 0,5% peroxidem vodíku; průtokové rychlosti: roztok luminolu = $7,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, roztok peroxidu = $6,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

V grafu je kromě nárůstu intenzity při optimálním pH 9,0 dobře vidět i ostré maximum při pH 9,0 pro koncentraci Cu^{2+} 25 mM. Tato koncentrace byla proto použita k přípravě dalších roztoků.

4.2.3 Měření antioxidační kapacity se standardem troloxem

Cílem dalších optimalizačních měření mělo být nalezení optimálních koncentrací standardu troloxu a optimálního objemu dávkovací smyčky pro proměření kalibrační závislosti. Standard trolox byl použit již v mé bakalářské práci.

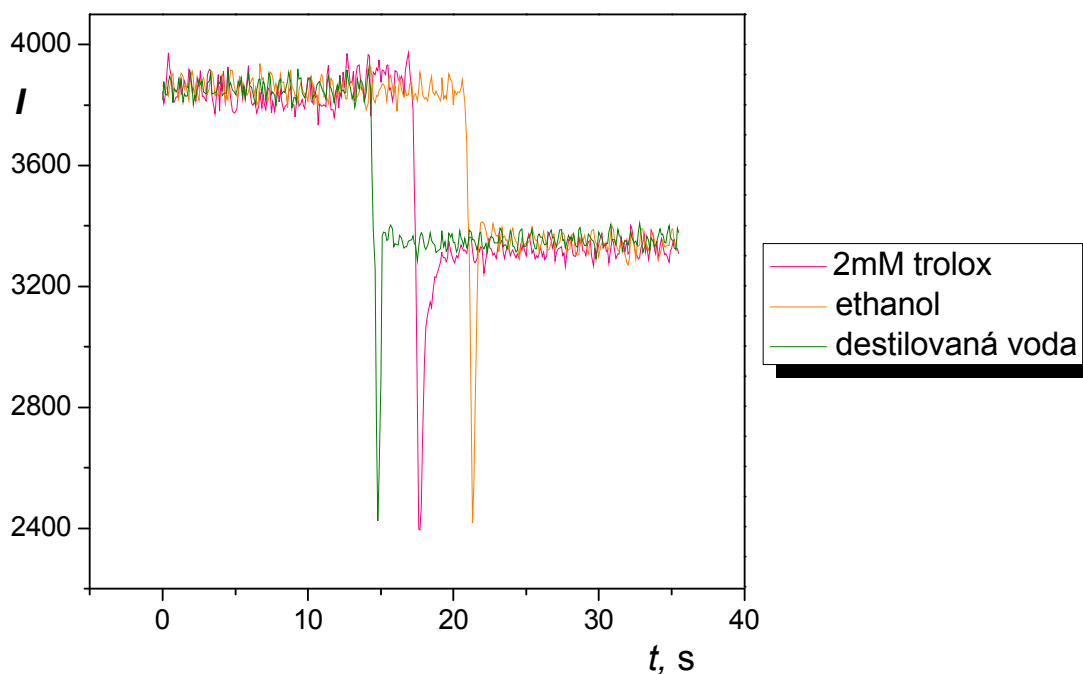
Byly připraveny roztoky 0,001 mM, 0,01 mM, 0,1 mM a 1 mM troloxu v ethanolu. Tyto roztoky byly do měřicí aparatury (Obr.4.2) aplikovány dávkovacím ventilem.

Pro každou koncentraci troloxu byly do aparatury postupně dávkovány objemy 30, 100, 250, 350, 500 a 750 μl . Chování standardu po jeho nadávkování však bylo neobvyklé. Při nadávkování různých objemů všech připravených roztoků s různou koncentrací troloxu byl vždy pozorován pokles signálu až na základní linii, což bylo projevem maximální

měřitelné antioxidační kapacity. Při zvyšování dávkovaného objemu byla pouze úměrně rozšiřována doba, po kterou se signál držel u základní linie.

Do systému bylo proto nadávkováno 30 μ l ethanolu (blank), poté i 30 μ l destilované vody. Oba dva roztoky byly příčinou totožných poklesů intenzity, jaké byly pozorovány při dávkování troloxu (Obr.3.8).

Vyhodnocením těchto výsledků bylo potvrzeno, že dvoukanálové uspořádání FIA aparatury není možné pro tento typ stanovení použít. V případě nadávkování rozpouštědla (ethanolu, vody), došlo ke značnému rozředění chemiluminiscenční reakční směsi a tedy k poklesu signálu. Zároveň byla dávkováním roztoků přes smyčku dávkovacího ventilu prodloužena dráha přivádějící směs reagentů ke kyvetě a chemiluminiskující roztok byl dopraven do kyvety se zpožděním. Důsledkem bylo další snížení intenzity chemiluminiscence. Snížení bylo dobře viditelné po proběhnutí reakce s antioxidantem, kdy intenzita chemiluminiscence nebyla vrácena na původní hladinu I_2 (viz. Obr. 4.1), nýbrž na hladinu nižší (viz. Obr. 4.9). (Při experimentu na obrázku 4.9. byly skutečné průtokové rychlosti v důsledku pokročilého poškození tygonových hadiček nižší, proto je nižší i dosažená hladina intenzity ve srovnání s předchozími).



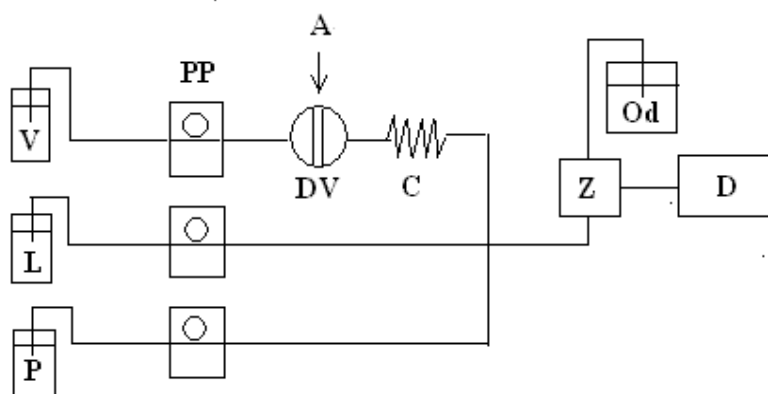
Obr.4.9: Časová závislost poklesu intenzity chemiluminiscence po přidání 30 μ l destilované vody, ethanolu a 2 mM troloxu

4.3 Měření s aparaturou FIA ve tříkanálovém zapojení

Na základě předchozích měření tedy bylo nutné upravit zapojení FIA aparatury a přejít ke tříkanálovému uspořádání. V tomto případě bylo nutné připojit třetí samostatný kanál, kterým byl antioxidant přiváděn do systému odděleně. Nosný tok v tomto kanálu byl tvořen destilovanou vodou a antioxidant byl dávkován dávkovacím ventilem do tohoto nosného proudu.

4.3.1 Měření s třetím kanálem připojeným 5 cm před kyvetu

Byla sestavena aparatura zobrazená na obrázku 4.10. Dráha mezi průtokovou kyvetou a spojením všech tří kanálů byla dlouhá 5,0 cm, celková reakční dráha antioxidantu od jeho kontaktu s chemiluminiscenčním roztokem až do detekční zóny detektoru byla 8 cm. Průtok destilované vody byl nastaven na $2,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, aby dosažené optimální podmínky nebyly výrazněji ovlivněny.



Obr.4.10: Schéma aparatury pro měření intenzity chemiluminiscence v tříkanálovém zapojení: V - destilovaná voda, L - roztok luminolu, P - roztok peroxidu vodíku, PP – peristaltické pumpy, A – roztok antioxidantu, DV – šesticečný dávkovací ventil, C – reakční cívka, Z – zetová průtoková kyveta, D – spektrofotometrický detektor, Od –odpad

V tomto uspořádání bylo provedeno několik zásadních pokusů vedoucích k důležitým závěrům.

Při současném průtoku všech 3 reagentů, tedy roztoku luminolu průtokovou rychlostí $7,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, peroxidu rychlostí $6,0 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$ a destilované vody rychlostí $2,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, bylo do systému třikrát nadávkováno $30 \mu\text{l}$ destilované vody, ethanolu a roztoků

0,01 mM, 0,1 mM a 1,0 mM troloxu v ethanolu. Totéž bylo zopakováno se smyčkou o objemu 500 μ l pro 0,1 mM trolox a ethanol.

Kromě destilované vody, jejíž nadávkování do systému se neprojeвило žádnou změnou, poskytovaly všechny ostatní nadávkované vzorky obdobné výsledky. Nadávkovaný ethanol byl příčinou přibližně stejně velkého poklesu signálu, jaký byl pozorován při nadávkování různě koncentrovaných standardů troloxu. Bylo zřejmé, že pro toto měření nelze použít organické rozpouštědlo, neboť použitý ethanol sám zhasel chemiluminiscenci. Jedinou možností bylo použít jako rozpouštědlo destilovanou vodu.

Trolox je však ve vodě nerozpustný. Bylo proto vyzkoušeno dávkovat do systému různě koncentrovaný trolox v různě naředěném ethanolu (trolox byl nejprve rozpuštěn v ethanolu, pak doplněn destilovanou vodou), ale výsledky nebyly nijak uspokojivé. Při nejnižších koncentracích ethanolu, kdy byl eliminován pokles intenzity signálu, způsobený tímto rozpouštědlem, nebyl pozorován ani žádný pokles signálu v důsledku reakce troloxu. To vše vedlo k jedinému závěru. Použít pro další měření jako standard jiný antioxidant, dokonale rozpustný ve vodě. Tímto antioxidantem je kyselina askorbová, tedy vitamín C. Kyselina askorbová je vedle troloxu běžně používána jako standard pro určení TAC.

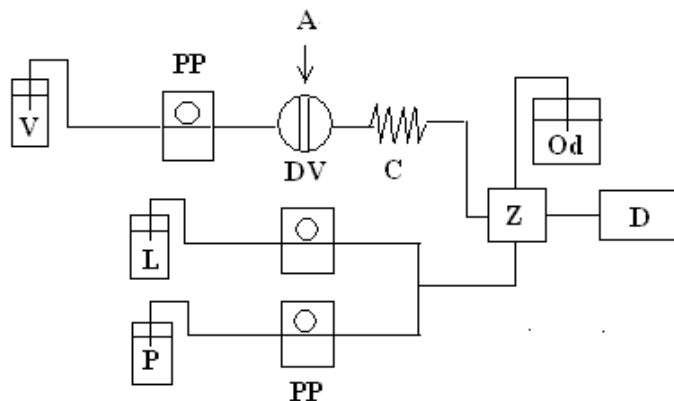
Jelikož při dávkování různě koncentrovaného Troloxu v čistém ethanolu nebyla zaznamenána změna poklesu signálu vůči poklesu způsobenému čistým ethanolem, bylo zjevné, že rozpouštědlo nebude jediným problémem. Z poznatků získaných při měření TAC dávkovou metodou v mé bakalářské práci bylo možno usoudit, že eliminace volných radikálů, probíhající v roztoku po nadávkování antioxidantu, je velmi rychlá.

Vzdálenost mezi soutokem všech 3 reagentů a detekčním prostorem kyvety byla v tomto FIA uspořádání 7,5 cm. Nabízela se tedy otázka, zda při současném uspořádání aparatury nedojde k reakci mezi antioxidantem a volnými radikály dříve, než reakční směs postoupí vedením do měřicí kyvety.

Vzhledem k tomu, že ani při zvyšování průtokové rychlosti antioxidantu nebyl pozorován žádný pokles signálu způsobený pouze Troloxem, bylo rozhodnuto zkrátit vzdálenost mezi spojením roztoku antioxidantu s chemiluminiskujícím roztokem na minimum. Kanál pro antioxidant byl proto připojen přímo na průtokovou kyvetu místo jednoho vstupu pro optické vlákno.

4.3.2 Měření se zapojením třetího kanálu přímo na kyvetě

Pro měření v tomto uspořádání byla nalezena inspirace v článku¹⁶⁶, kde byl podobný typ zapojení také použit. Byla sestavena aparatura znázorněná na obrázku 4.11.



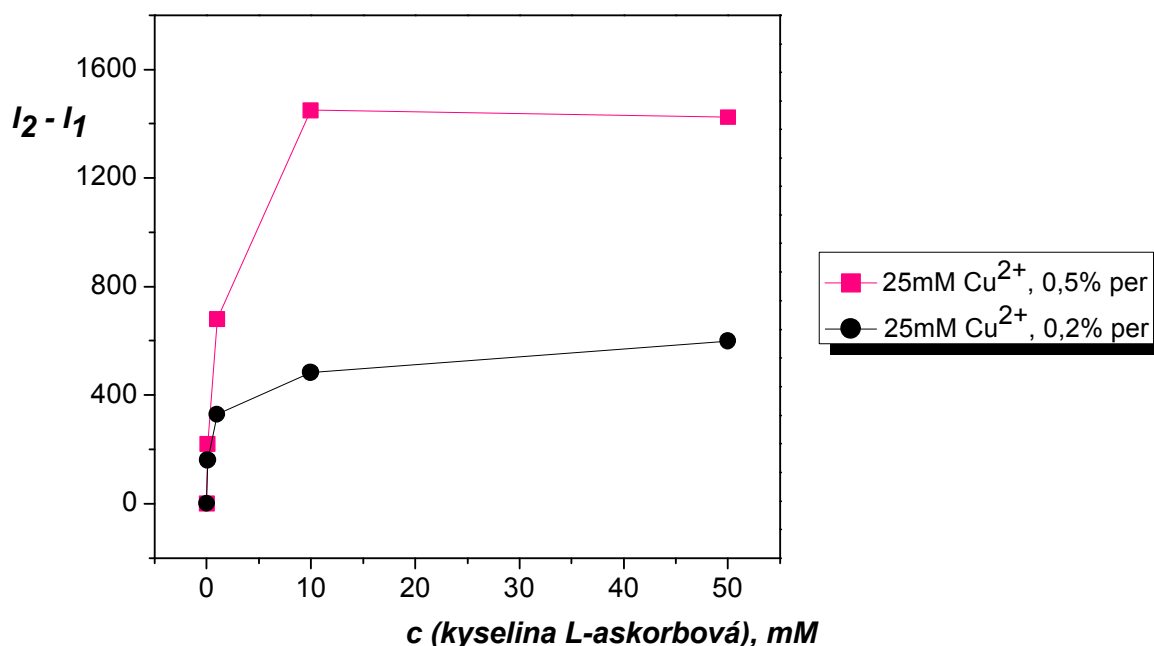
Obr.4.11: Schéma aparatury pro měření intenzity chemiluminiscence s připojením třetího kanálu přímo na kyvetu: V- destilovaná voda, L – roztok luminolu, P – peroxid, PP – peristaltické pumpy, A – roztok antioxidantu, DV – šesticečný dávkovací ventil, C – reakční cívka, Z – zetová průtoková kyveta, D – spektrofotometrický detektor, Od - odpad

V tomto uspořádání bylo tedy spojení mezi roztokem antioxidantu a chemiluminiskujícím roztokem realizováno přímo v průtokové kyvetě na začátku jejího detekčního prostoru a tak bylo možné detegovat pokles chemiluminiscenčního záření ihned po kontaktu antioxidantu s chemiluminiskujícím roztokem.

V tomto uspořádání bylo cílem nalézt vhodný objem pro dávkování standardu (kyseliny L-askorbové) a proměřit kalibrační závislost. Při optimálních podmínkách popsaných v pododdílu 4.2.2 a při průtoku nosného proudu $2,0 \text{ ml.s}^{-1}$ byly do systému s proudícím chemiluminiskujícím roztokem postupně nadávkovány následující koncentrace vitamínu C: 0,01 mM, 0,1 mM, 1,0 mM, 10 mM, 50 mM. Dávkované objemy byly: 30 μl , 100 μl a 500 μl .

Se zvyšováním dávkovaného objemu byly poklesy intenzity podobné, byla pouze úměrně rozšiřována doba, po kterou se signál držel na nižší hladině intenzity. Maximální poklesy, které byly pozorovány, dosahovaly pouze jedné třetiny maximálního možného poklesu k základní linii a to pro koncentrace 10 mM a větší. Pro koncentrace 0,01 mM nebyl pozorován žádný rozpoznatelný pokles. Zvětšení poklesů nebylo zaznamenatelné ani po úpravách průtokových rychlostí chemiluminiscenčního roztoku luminolu, roztoku peroxidu a standardu. Rozsah poklesů intenzit byl při nižších koncentracích tak malý, že

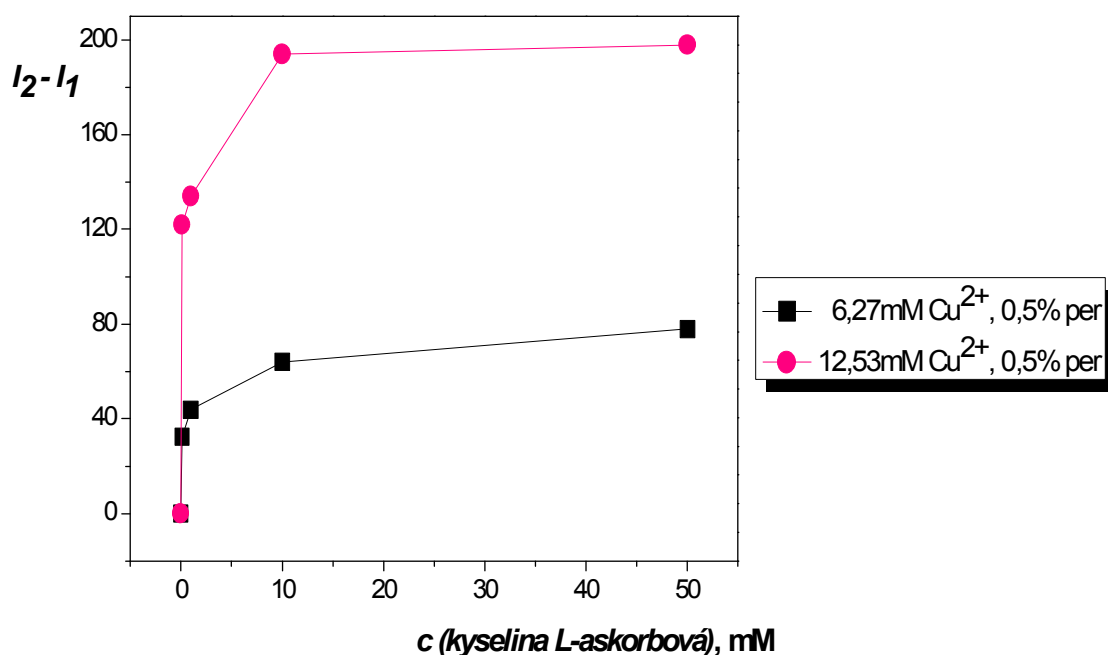
nebylo možné z něj sestrojít kalibrační závislost. (Obr. 4.12, graf závislosti pro 25mM CuSO₄ a 0,5% peroxid).



Obr.4.12: Závislost poklesů intenzity chemiluminiscenčního záření na přidavcích různých koncentrací kyseliny L-askorbové o objemech 30 μ l; závislosti pro 0,2% a 0,5% peroxid použitý při reakci s roztokem luminolu o koncentraci CuSO₄ 25 mM; průtokové rychlosti: roztok luminolu 7,4 ml.min⁻¹, roztok peroxidu 6,0 ml.min⁻¹, destilovaná voda 2 ml.min⁻¹, pH = 9,0

Nabízelo se vysvětlení, že antioxidační aktivita vitamínu C nebyla dostačující pro zneškodnění radikálů uvolněných během chemiluminiscenční reakce takto připravených optimalizovaných roztoků luminolu a peroxidu vodíku, případně nebyla dostačující kvůli rychlosti proběhnutí reakce způsobené katalyzátorem Cu²⁺. Byly proto připraveny nové roztoky luminolu se stejným obsahem pufru (pododdíl 4.2.2.1) a luminolu (pododdíl 4.2.2.2), ale s různou koncentrací CuSO₄, (konkrétně 6,27 mM a 12,53 mM) a roztoky peroxidu vodíku o objemových koncentracích 0,2 % a 0,5 %.

Výsledky měření s těmito roztoky jsou k dispozici na obrázcích 4.12 a 4.13. Na ose y je zanesen rozdíl mezi intenzitou I₂ chemiluminiscenčního záření před přidáním antioxidantu a intenzitou I₁ po poklesu intenzity způsobené přidáním antioxidantem (zde standardem vitamínem C).



Obr.4.13: Závislost poklesů intenzity chemiluminiscenčního záření na přídavcích různých koncentrací kyseliny L-askorbové o objemech 30 μ l; závislosti pro roztoky luminolu s koncentracemi CuSO_4 6,27 mM a 12,53 mM, koncentrace použitého peroxidu vodíku = 0,5 %, průtokové rychlosti: roztok luminolu 7,4 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, roztok peroxidu 6,0 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\text{pH} = 9,0$

Jak je z obrázků patrné, při úpravě koncentrací použitých roztoků byly pouze sníženy dosažené intenzity chemiluminiscence a tím byly i úměrně sníženy velikosti poklesů intenzit po přídavcích různě koncentrovaného standardu. Namísto požadovaných zvětšení rozsahů poklesů tak bylo dosaženo přesně opačného efektu. Kromě toho, jak je vidět na obrázcích, by mohly být závislosti poklesů intenzit lineární pouze pro přidané koncentrace kyseliny askorbové nižší než 0,1mM, kdy už nebyly poklesy rozpoznatelné. Navíc při tak malých koncentracích by nebyla kalibrační závislost kvůli malým rozsahům intenzity měřitelná.

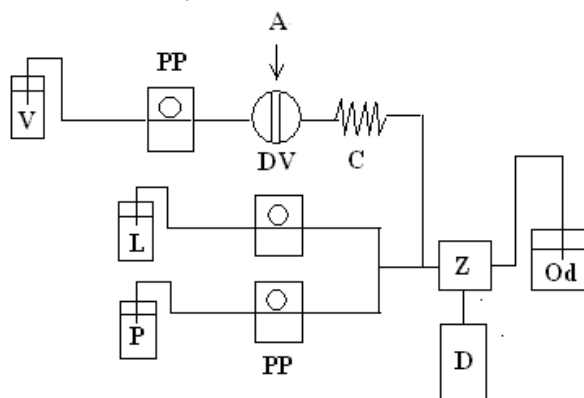
Původní myšlenka, že TAC antioxidantu je nedostačující pro eliminaci uvolněných radikálů tak nebyla potvrzena. Po snížení koncentrací činidel způsobujících uvolnění radikálů v chemiluminiscenčním roztoku při současném přidání stejných koncentrací antioxidantu k již chemiluminiscujícímu roztoku nebyl pozorován žádný větší úbytek těchto radikálů, jenž by se projevil zvětšením poklesu intenzity.

Při vyhodnocování všech získaných záznamů byl patrný stejný trend, pokles intenzity zhruba o jednu třetinu jejího maximálního možného poklesu k základní linii. To bylo inspirací pro vznik další myšlenky. Pokud nebyly volné radikály eliminovány antioxidantem dostatečně rychle, byla při průchodu detekčním prostorem kyvety eliminována jen jejich část, tedy uhašena jen část celkového uvolněného záření. Zaznamenaný pokles intenzity byl pak pouze zlomkem z celkového úbytku intenzity, jaký by byl pozorovatelný při kompletním průběhu reakce v kyvetě a velikost tohoto zlomku musela být při stejném průběhu reakce stejná. Tato úvaha byla podpořena i faktem, že kompletní antioxidační reakce musela být uskutečněna okamžitě při kontaktu antioxidantu s chemiluminiskujícím roztokem v kyvetě, v jiném případě byla klesající intenzita záření roztoku při průchodu detekčním prostorem postupně přesvicována zářením s vyšší intenzitou pocházejícím z reagentů přitékajícím za ním, vystaveným reakci s antioxidantem o něco později.

Poslední možností bylo upravit reakční vzdálenost nutnou pro proběhnutí reakce mezi antioxidantem a chemiluminiskujícím roztokem tak, aby do detekčního prostoru kyvety doputoval chemiluminiskující roztok společně s antioxidantem přesně v okamžiku kompletního proběhnutí reakce, tedy v momentu maximálního poklesu signálu. Po pokusech provedených v tomto zapojení a v zapojení popsaném v pododstavci 4.2.3, bylo zjevné, že bylo zapotřebí zkrátit tuto reakční vzdálenost na minimum, ale zároveň ji ponechat mimo kyvetový prostor.

4.3.3 Měření v konečném FIA zapojení

Byla sestavena aparatura na obrázku 4.14. Dráha pro reakci antioxidantu s chemiluminiskujícím roztokem před kyvetou byla zkrácena na 1,5 cm, celková reakční dráha antioxidantu od jeho kontaktu s chemiluminiscenčním roztokem až do detekční zóny detektoru byla 4,5 cm. Vzdálenost mezi spojením roztoků luminolu a peroxidu a detekční zónou kyvety byla 12,5 cm.



Obr.4.14: Schéma aparatury pro měření intenzity chemiluminiscenčního záření v konečném zapojení: V – destilovaná voda L – roztok luminolu, P – roztok peroxidu, PP – peristaltické pumpy, A – roztok antioxidantu, DV – šesticestný dávkovací ventil, C – reakční cívka, Z – zetová kyveta, D – spektrofotometrický detektor, Od – odpad

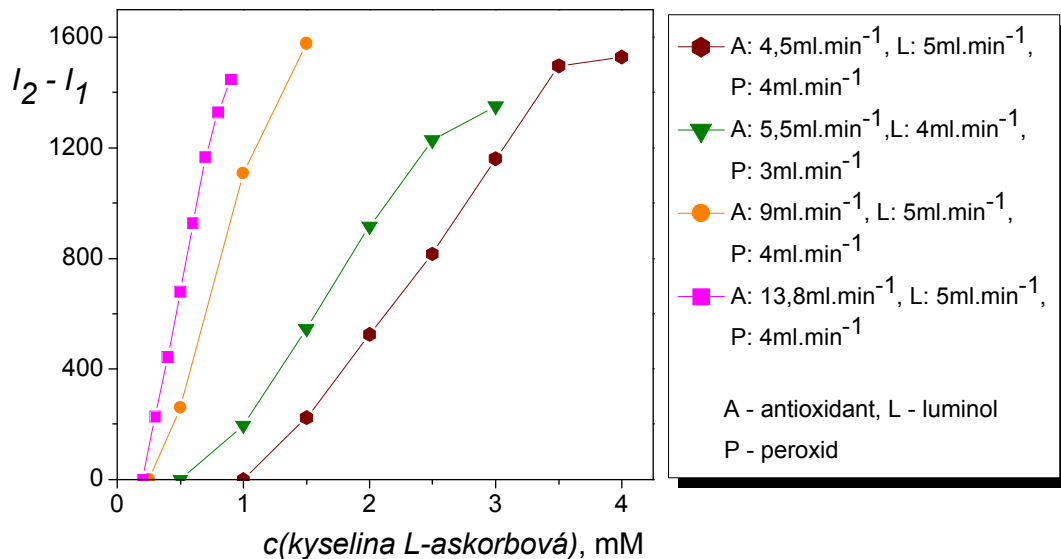
4.3.3.1 Finální optimalizační kroky

Do systému byly při průtokových rychlostech $7,4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ $11,3 \text{ mM}$ roztoku luminolu, $6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ $0,5\%$ peroxidu a $2,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ destilované vody dávkovány objemy 30, 100, 250 a $500 \text{ } \mu\text{l}$ kyseliny L-askorbové o koncentracích: 0,5 mM, 1,0 mM, 2,0 mM a 3,0 mM (vždy třikrát). Při takto nastavených průtokových rychlostech se nadávkovaný antioxidant neprojevil. Se zvyšující se průtokovou rychlostí destilované vody (tedy i antioxidantu) byl při dávkování různě koncentrovaných standardů pozorován postupný nárůst poklesu intenzity úměrný nejen zvyšující se koncentraci standardů, ale i postupnému nárůstu rychlosti. Při dávkování $30 \text{ } \mu\text{l}$ byly poklesy intenzity menší a nestejnomyšlné, při dávkovaném objemu $100 \text{ } \mu\text{l}$ taktéž nebyly poklesy intenzity srovnatelné. Byly však dokonale opakovatelné a čitelné při dávkovaném objemu $500 \text{ } \mu\text{l}$, kdy byl zaručen dostatečný přísun antioxidantu pro reakci. Jako optimální dávkovaný objem roztoku antioxidantu byl proto vybrán objem $500 \text{ } \mu\text{l}$.

Se zvyšující se průtokovou rychlostí destilované vody byly nejprve úměrně snižovány průtokové rychlosti roztoku luminolu a peroxidu, aby celková průtoková rychlost reagentů aparaturou nebyla příliš vysoká a nebyla tak příčinou destrukce některých částí aparatury.

Při různých průtokových rychlostech jednotlivých reagentů byly změřeny TAC různě koncentrovaných roztoků standardů pro sestavení kalibračních závislostí. Byly

pozorovány neobvyklé trendy. Všechny závislosti vykazovaly v určitém úseku linearitu, ale neprocházely nulou. Se zvyšující se průtokovou rychlostí antioxidantu byly tyto závislosti posouvány po ose x směrem k nule. (Obr.4.15)



Obr.4.15: Závislosti poklesů intenzit chemiluminiscence na přidavcích 500 μ l různé koncentrované kyseliny L-askorbové při odlišných průtokových rychlostech jednotlivých reagentů; koncentrace: luminol 11,3mM, peroxid 0,5%, $c(\text{CuSO}_4) = 25\text{mM}$; $\text{pH} = 9$

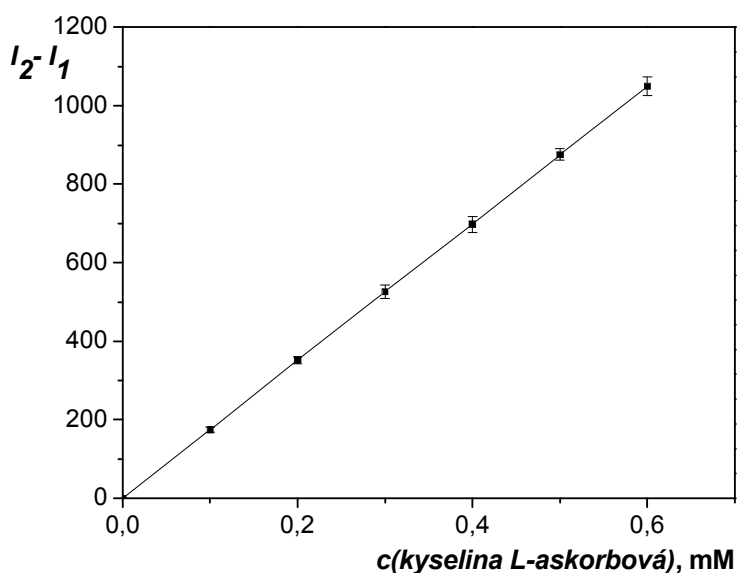
Vzhledem k tomu, že se snižující se průtokovou rychlostí chemiluminiskujícího roztoku se snižovala i intenzita vybuzeného chemiluminiscenčního záření, bylo zjevné, že bylo zapotřebí udržet průtokovou rychlost chemiluminiskujícího roztoku nejméně na hodnotě 7,0 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ (součet průtokových rychlostí roztoků peroxidu a luminolu), aby byla dosažena hodnota intenzity dostatečně vysoká pro měření kalibrační závislosti, a zároveň zvyšovat průtokovou rychlost destilované vody s antioxidantem tak dlouho, dokud byla kalibrační závislost posouvána k nule. Celková průtoková rychlost v aparatuře tak byla nucena trojnásobně překročit rychlost doporučenou, nicméně všechny části aparatury byly při všech měřeních shledány bez úhony. Průtok pro antioxidant byl postupně nastaven až na maximální hodnotu 13,8 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Dávkové koncentrace standardu vitamínu C byly 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM, 3,0 mM, 3,5 mM a 4,0 mM při průtokových rychlostech roztoku antioxidantu 4,5 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, luminolu 5,0 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a peroxidu 4,0 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Podobně byly dávkové koncentrace vitamínu C 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM a 3,0 mM při průtocích roztoku antioxidantu 5,5 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, luminolu 4,0 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a peroxidu 3,0 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$; dále pak 0,25 mM 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM při

průtocích roztoku antioxiidantu $9,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, luminolu $5,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, peroxidu $4,0 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$ a $0,1 \text{ mM}$, $0,2 \text{ mM}$, $0,3 \text{ mM}$, $0,4 \text{ mM}$, $0,5 \text{ mM}$, $0,6 \text{ mM}$, $0,7 \text{ mM}$, $0,8 \text{ mM}$ a $0,9 \text{ mM}$ při průtocích roztoku antioxiidantu $13,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, luminolu $5,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a peroxidu $4,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ (Obr.4.15).

4.3.3.2 Kalibrační závislost kyseliny L-askorbové

Se zvýšením poměru maximální průtokové rychlosti antioxiidantu vůči průtokové rychlosti chemiluminiskujícího roztoku bylo patrné na kalibrační závislosti mírné snížení citlivosti a zároveň i mírný posun po ose x k nule. Snížením průtokové rychlosti chemiluminiskujícího roztoku z celkových $9,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ (roztok luminolu $5,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, roztok peroxidu $4,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) na $8,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ (roztok luminolu $4,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, roztok peroxidu $3,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) při zachování maximální průtokové rychlosti roztoku antioxiidantu tak bylo docíleno průchodu kalibrační křivky nulou.

Bylo dávkováno pětkrát $500 \text{ } \mu\text{l}$ $0,1 \text{ mM}$, $0,2 \text{ mM}$, $0,3 \text{ mM}$, $0,4 \text{ mM}$, $0,5 \text{ mM}$, $0,6 \text{ mM}$ a $0,7 \text{ mM}$ kyseliny L-askorbové; naměřené hodnoty z každých 5 pokusů byly zprůměrovány a vyneseny do grafu. Při nadávkování $0,7 \text{ mM}$ standardu byl pokles intenzity signálu zastaven hladinou základní linie, byl tedy větší než rozsah intenzit pro kalibrační měření a není proto v kalibrační závislosti na obrázku 4.16 uveden.



Obr.4.16: Kalibrační závislost určení TAC, vztažená na koncentraci kyseliny L-askorbové dávkováno $500 \text{ } \mu\text{l}$, koncentrace: luminol $11,3 \text{ mM}$, peroxid $0,5\%$, CuSO_4 25 mM ; průtokové rychlosti: antioxiidant $13,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, luminol $4,5 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$, peroxid $3,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, $\text{pH} = 9,0$

Rovnice kalibrační přímky kyseliny L-askorbové na obrázku 4.16: $y = 1749x + 0,4714$

4.3.3.3 Základní charakteristiky stanovení TAC vztažené na standard kyseliny L-askorbové

Po proměření kalibrační závislosti, byly určeny základní charakteristiky stanovení TAC touto nově připravenou průtokovou metodou. Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vypočítány z 10 změřených poklesů intenzit chemiluminiscence po přidání 0,1mM kyseliny L-askorbové za stejných podmínek, které jsou uvedeny u grafu kalibrační závislosti. Hodnoty těchto poklesů byly pomocí rovnice kalibrační přímky přepočítány na koncentrace a ze směrodatné odchylky σ byla vypočítána mez detekce (3σ) a mez stanovitelnosti (10σ). Při stejných podmínkách byly desetkrát změřeny hodnoty poklesů pro 0,6mM kyselinu L-askorbovou a z nich byla vypočítána opakovatelnost jako relativní směrodatná odchylka. Citlivost byla určena jako směrnice kalibrační přímky. Dále byla odhadnuta průchodnost vzorků aparaturou, tedy maximální frekvence analýzy.

Tab 4.1: Základní charakteristiky chemiluminiscenčního stanovení TAC

charakteristika	výsledek	Jednotky
mez detekce	0,025	mmol.dm ⁻³ (mM)
mez stanovitelnosti	0,084	mmol.dm ⁻³ (mM)
opakovatelnost (% RSD)	2,43	%
citlivost	1749	dm ³ .mmol ⁻¹
frekvence analýzy	450	vzorků.hodinu ⁻¹

4.3.3.4 Měření reálných vzorků

Pro měření reálných vzorků byly použity experimentální podmínky přehledně shrnuté v tabulce 4.2..

Do průtokového systému bylo vždy dávkováno pětkrát 500 μ l roztoku různých vzorků antioxidantů naředěných destilovanou vodou tak, aby jimi způsobené poklesy signálu odpovídaly rozsahu kalibrační závislosti. Z rovnice kalibrační přímky byly

naměřené hodnoty poklesů intenzit přepočteny na koncentrace kyseliny L-askorbové a průměrná hodnota vypočtená pro každý vzorek vyjádřena jako VCEAC v mg kyseliny L-askorbové na 1g vzorku u pevných vzorků nebo v mg na 1ml u vzorků kapalných.

Tab 4.2. *Optimální podmínky pro měření TAC vzorků*

Optimalizovaný parametr	hodnoty	jednotky
pH	9,0	—
koncentrace peroxidu	0,5	objemová %
koncentrace luminolu	11,3	mM
koncentrace CuSO ₄	25	mM
průtoková rychlost peroxidu vodíku	3,5	ml.min ⁻¹
průtoková rychlost roztoku luminolu	4,5	ml.min ⁻¹
průtoková rychlost antioxidantu	13,8	ml.min ⁻¹
dávkový objem antioxidantu	500	μl
délka reakční dráhy antioxidantu	4,5	cm

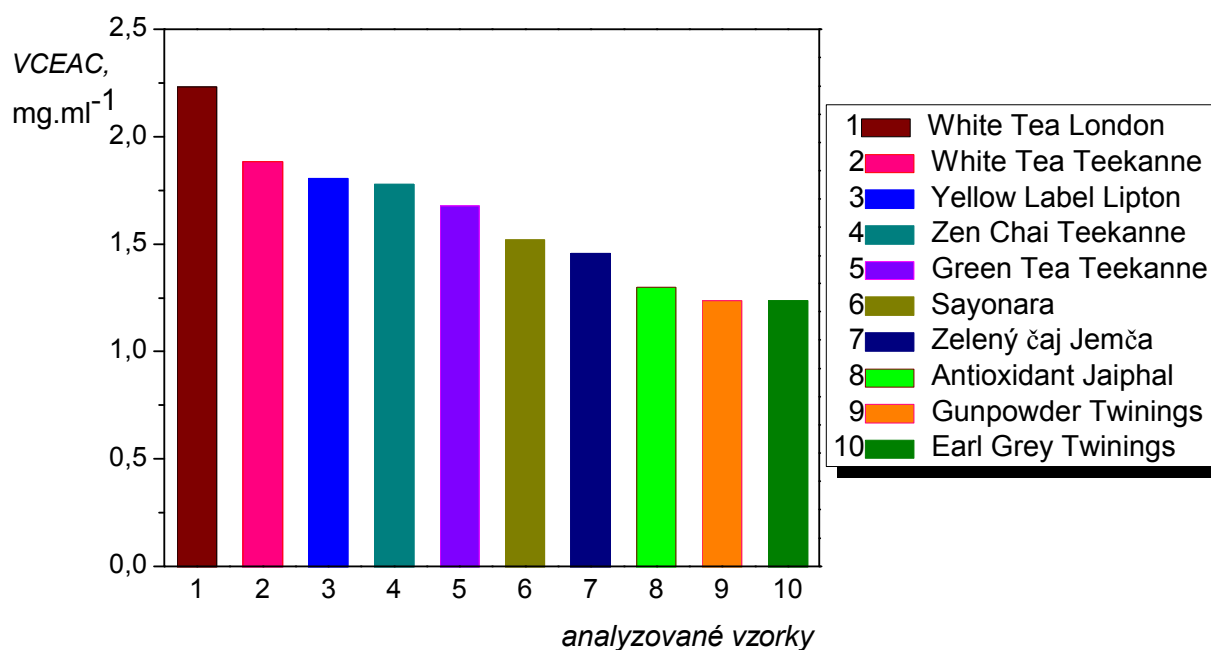
Tyto hodnoty jsou vztaženy na roztok luminolu v uhličitanovém pufru o složení definovaném v pododstavci 4.2.2.1 a omezenou délku dráhy chemiluminiskujícího roztoku (vzdálenost mezi spojením roztoků luminolu a peroxidu a detekční zónou kyvety je v tomto zapojení 12,5 cm).

4.3.3 4.1 Výsledky měření TAC čajů

Vzorky čajů byly zality 250ml vroucí vody a ponechány louhovat 3 minuty. U sáčkových čajů byl zalit vždy 1 sáček, u sypaných čajů 1 zarovnaná čajová lžička. Před zalitím byly všechny použité vzorky zváženy. Extrakty sypaných čajů byly následně přefiltrovány a všechny čaje byly naředěny destilovanou vodou. Earl Grey byl naředěn patnáctkrát, London White Tea dvacetpětkrát, ostatní čaje dvacetkrát. Byla vypočtena TAC vyjádřená jako VCEAC ve 250 ml každého připraveného nezředěného čajového extraktu a VCEAC připadající na 1 gram suchých vzorků.

Tab 4.3: Hmotnosti navážených vzorků, VCEAC čajových extraktů a suchých vzorků čaje

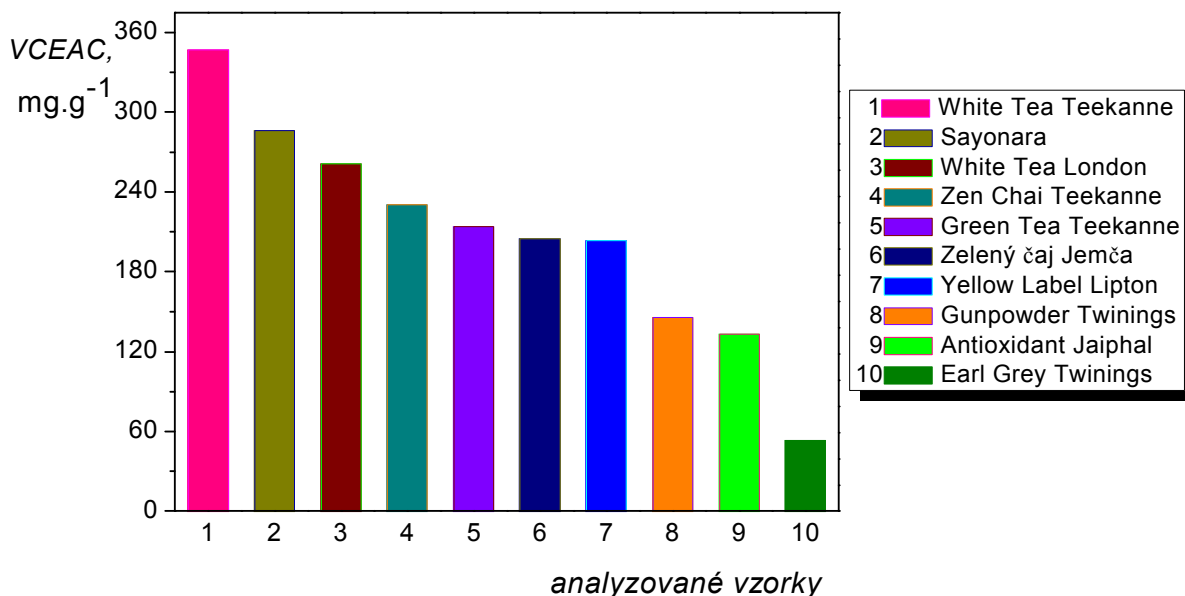
<i>druh čaje</i>	<i>hmotnost čaje v sáčku/na lžičce, g</i>	<i>VCEAC Mmol/l</i>	<i>VCEAC mg/250ml</i>	<i>VCEAC mg/1ml</i>	<i>VCEAC mg/1g vzorku</i>
White Teekanne	1,3567	10,69 ± 0,14	471 ± 6	1,88 ± 0,02	347 ± 4
White London	2,1346	12,68 ± 0,18	558 ± 8	2,23 ± 0,03	262 ± 4
Sayonara	1,3257	8,62 ± 0,16	380 ± 7	1,52 ± 0,03	286 ± 5
Zen Chai	1,9317	10,10 ± 0,14	445 ± 6	1,78 ± 0,02	230 ± 3
Green Teekanne	1,9586	9,53 ± 0,09	420 ± 4	1,68 ± 0,02	214 ± 2
Zelený Jemča	1,7780	8,27 ± 0,16	364 ± 7	1,46 ± 0,03	205 ± 4
Yellow Label	2,2200	10,26 ± 0,02	452 ± 1	1,81 ± 0,00	203 ± 0
Jaiphal	2,4379	7,37 ± 0,14	324 ± 6	1,30 ± 0,02	133 ± 2
Gunpowder	2,1230	7,03 ± 0,11	309 ± 5	1,24 ± 0,02	146 ± 2
Earl grey	1,2462	1,51 ± 0,07	66 ± 3	0,27 ± 0,01	53 ± 2



Obr.4.17: Srovnání celkového obsahu antioxidantů v nezřaděných čajových extraktech připravených podle uvedeného postupu

Celková antioxidační aktivita sypaných nemletých čajů byla naměřena nižší než

TAC čajů sáčkových. To mohlo být způsobeno stanovenou dobou louhování, jež byla univerzální pro všechny vzorky, ale pravděpodobně nedostačující pro sypané čaje.



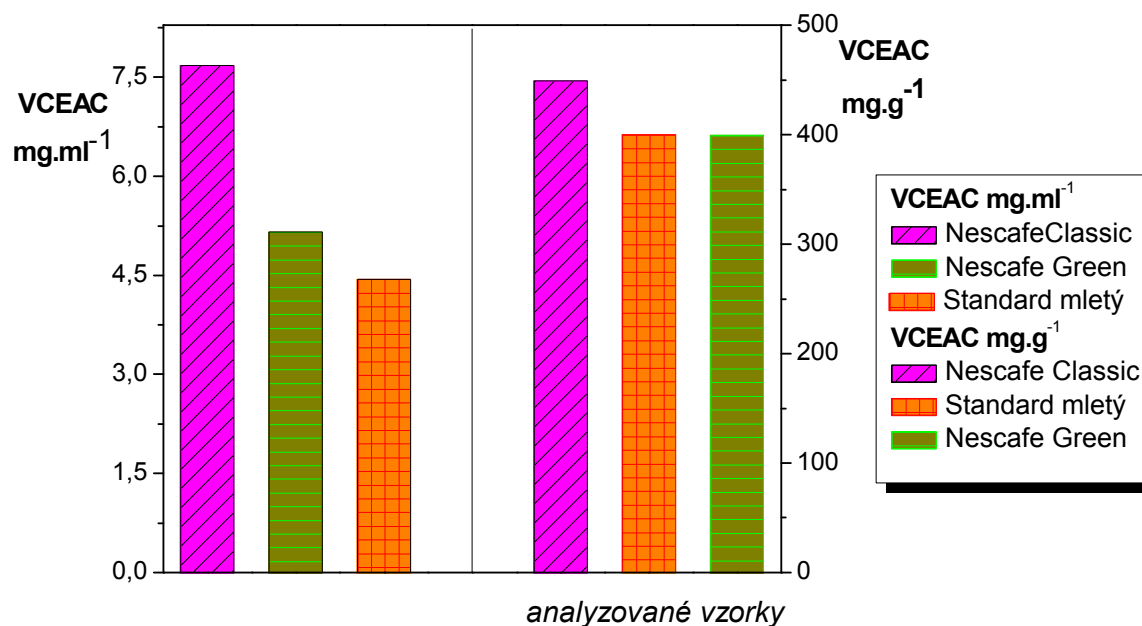
Obr 4.18: Srovnání celkového obsahu antioxidantů v suchých vzorcích

4.3.3.4.2 Výsledky měření TAC vzorků kávy

Každý vzorek kávy, odpovídající dvěma zarovnaným čajovým lžičkám, byl zvážen, zalit 200 ml vroucí vody a ponechán louhovat 3 minuty. Extrakt získaný z pražené mleté kávy byl přefiltrován. Takto připravené kávy byly pro analýzu naředěny destilovanou vodou, Nescafe Green Blend padesátkrát, mletý Standard osmdesátkrát a Nescafe Classic stokrát. Byla vypočtena TAC vyjádřená jako VCEAC v mmol/l nezředěných roztoků, přepočtena na VCEAC ve 200 ml každé připravené kávy a VCEAC připadající na 1 gram suchých vzorků.

Tab.4.4: Navážky vzorků, VCEAC kávových nápojů a suchých vzorků

druh kávy	navážka vzorku, g	VCEAC mmol/l	VCEAC mg/200ml	VCEAC mg/ml	VCEAC mg/g vzorku
Nescafe Classic	3,417	43,56 ± 0,26	1534 ± 9	7,67 ± 0,05	449 ± 3
Nescafe Green	2,581	29,26 ± 0,28	1031 ± 10	5,15 ± 0,05	399 ± 4
Standard mletý	2,220	25,22 ± 0,74	888 ± 26	4,44 ± 0,13	400 ± 12



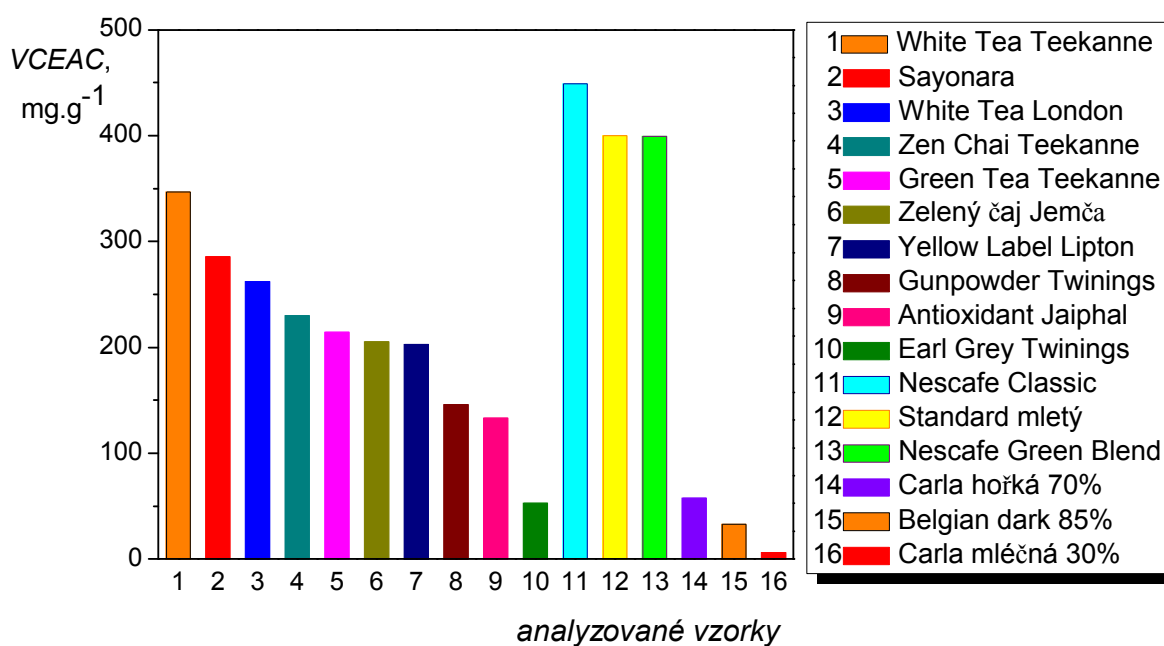
Obr.4.19.: Srovnání celkového obsahu antioxidantů v kávových nápojích a suchých vzorcích kávy

4.3.3.4.3 Výsledky měření TAC čokolád

Vzorky čokolády o velikosti 1 dílku čokolády byly zváženy a rozemlety na multifunkčním kuchyňském robotu. Vzniklé směsi čokoládového prášku a čokoládových tukových usazenin byly zality 200ml vroucí vody. Po 3 minutách stání byly čokoládové roztoky 15 minut filtrovány přes papírový filtr a naředěny destilovanou vodou. Čokoláda Carla mléčná byla naředěna pětkrát, Carla hořká dvacetkrát a čokoláda Belgian dark dvanáct a půlkrát. Byla vypočtena TAC vyjádřená jako VCEAC v mmol.l⁻¹ nezředěných roztoků a přepočtena na VCEAC v mg na 1g čokolády.

Tab.4.5: Navážky vzorků, VCEAC čokoládových extraktů a suchých vzorků čokolády

druh čokolády	navážka, g	VCEAC mmol/l	VCEAC mg/200ml	VCEAC mg/g vzorku
Carla hořká 70%	5,8204	9,50 ± 0,03	335 ± 1	57,5 ± 0,2
Belgian dark 85%	5,9532	5,56 ± 0,17	196 ± 6	32,9 ± 1,1
Carla mléčná 30%	5,8818	1,06 ± 0,06	37 ± 2	6,4 ± 0,4



Obr.4.20: Srovnání celkového obsahu antioxidantů v suchých vzorcích čaje, kávy a čokolády

Ze získaných výsledků je patrné, že v 1 větším dílku (necelých 6 gramech) kvalitní hořké čokolády může být obsaženo přibližně tolik antioxidantů, jako v jednom šálku zeleného čaje.

4.3.3.4.4 Výsledky měření TAC pív, vín a čerstvých ovocných šťáv

Všechny vzorky byly pro analýzu naředěny destilovanou vodou. Vzorky pív byly naředěny dvacetpětkrát, vzorky vín padesátkrát a čerstvé ovocné šťávy padesátkrát. Ovocné šťávy byly přefiltrovány přes papírový filtr. Byla vypočtena TAC vyjádřená jako VCEAC v mmol.l⁻¹ nezředěných vzorků a přepočtena na VCEAC v mg na 1ml každého vzorku.

Tab.4.6: VCEAC pív

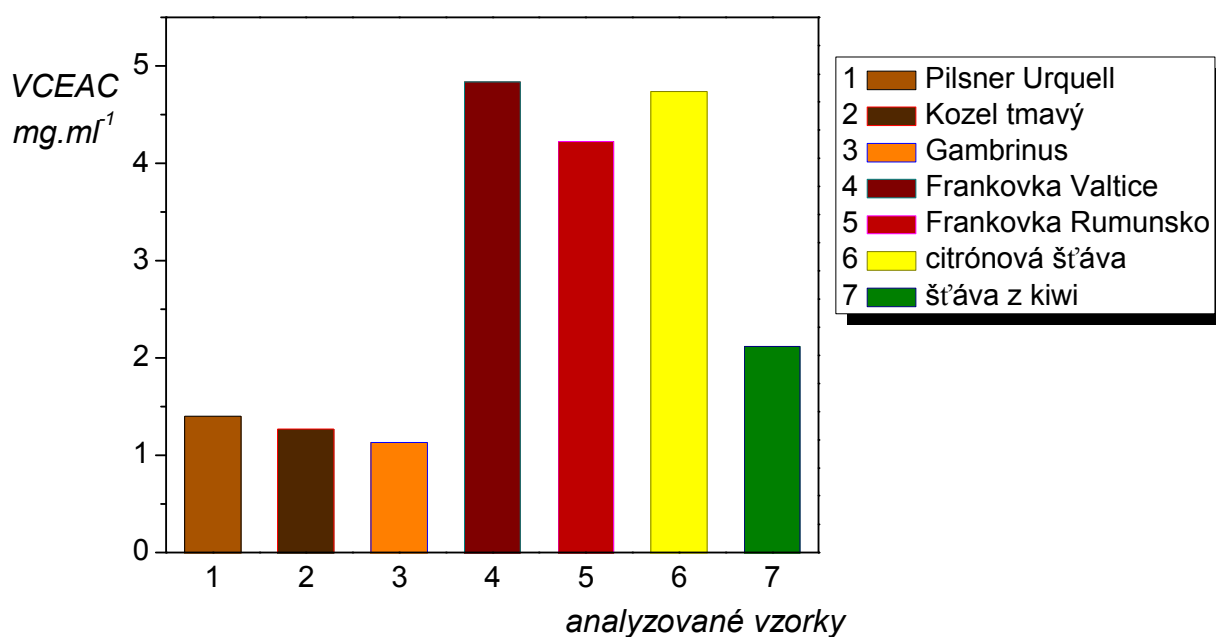
druh piva	VCEAC, mmol.l ⁻¹	VCEAC, mg.ml ⁻¹
Pilsner Urquell	7,96 ± 0,37	1,40 ± 0,07
Kozel černý	7,22 ± 0,30	1,27 ± 0,05
Gambrinus	6,42 ± 0,18	1,13 ± 0,03

Tab.4.7: VCEAC vín

<i>druh vína</i>	<i>VCEAC, mmol.l⁻¹</i>	<i>VCEAC, mg.ml⁻¹</i>
Frankovka Valtice	27,47 ± 0,31	4,84 ± 0,05
Frankovka Rumunsko	24,02 ± 0,57	4,23 ± 0,10

Tab.4.8: VCEAC čerstvých ovocných šťáv

<i>druh šťávy</i>	<i>VCEAC, mmol.l⁻¹</i>	<i>VCEAC, mg.ml⁻¹</i>
citrónová šťáva	26,94 ± 0,52	4,74 ± 0,09
šťáva z kiwi	12,01 ± 0,70	2,12 ± 0,12



Obr.4.21: Srovnání celkového obsahu antioxidantů v analyzovaných pivech, vínech a čerstvých ovocných šťávách

4.3.3.4.5 Výsledky měření TAC v syntetických doplncích stravy

Doplňky stravy ve formě pilulek byly ponechány stát při pokojové teplotě (produkt GS pro urychlení rozpouštění při 40°C) v různých množstvích destilované vody až do kompletního rozpadu tablety (15 minut – 3 hodiny). Během rozpouštění bylo roztoky

několikrát intenzivně mícháno, usazená matrice byla následně odstraněna filtrací. Připravený vzorek Celaskonu byl pro analýzu dvacetkrát naředěn ze 100 mililitrů, vzorek Bioaktivního selenu a zinku byl naředěn pětkrát z 200ml, Antioxidant firmy Walmark pětkrát ze 100 ml. Ostatní vzorky nebylo zapotřebí ředit vzhledem k velmi nízké naměřené hodnotě antioxidační aktivity. Pilulka firmy Harmony Line a selen firmy Walmark byly rozpuštěny v 50 ml destilované vody, pilulka firmy GS Pharmaceuticals v 70 ml. Byla vypočtena TAC vyjádřená jako VCEAC v mmol.l^{-1} nezředěných roztoků a přepočtena na VCEAC v mg na 1 tabletu.

Tab 4.9: VCEAC doplňků stravy

<i>doplňek stravy</i>	<i>VCEAC mmol.l^{-1}</i>	<i>VCEAC mg/tabl</i>	<i>TAC podle výrobce mg/tabl</i>	<i>antioxidanty nerozpustné ve vodě, mg/tabl</i>
Celaskon Zentiva	$5,52 \pm 0,13$	$97,28 \pm 2,26$	100,000	—
Antioxidant Walmark	$2,36 \pm 0,06$	$41,60 \pm 1,00$	67,525	17,55
Bioaktivní Se + Zn	$1,83 \pm 0,07$	$64,30 \pm 2,51$	93,050	16,00
GS Vitamín E, Se a Zn	$0,31 \pm 0,01$	$3,82 \pm 0,18$	82,050	67,00
Harmony Line, Se + Z n	$0,12 \pm 0,01$	$1,09 \pm 0,08$	5,030	—
Selen Walmark	—	—	0,100	—

Pro extrahování tablet nebylo možno použít jiné rozpouštědlo než destilovanou vodu (důvody byly vysvětleny v oddílu 4.3.1). V některých tabletách byly obsaženy i antioxidanty ve vodě nerozpustné vázané na tukovou matrici, které nebylo možno převést do vodného rozpouštědla. TAC získaná analýzou takovýchto pilulek byla proto nižší než celková TAC uvedená výrobcem (Tab.4.9, oddíl 3.3.2). Nicméně z výsledku analýzy celaskonu, obsahujícího pouze ve vodě rozpustný vitamín C, je patrné, že byla vyvinuta spolehlivá metoda stanovení TAC.

5 DISKUZE ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ

Byla úspěšně vyvinuta metoda stanovení celkového obsahu antioxidantů průtokovou injekční analýzou s chemiluminiscenční detekcí. Vývoj této metody byl provázen řadou komplikací technického i chemického charakteru, které byly postupně úspěšně odstraněny.

Bylo nalezeno složení chemiluminiscenčního roztoku poskytující po oxidaci dlouhodobou chemiluminiscenci a také optimální experimentální podmínky, při nichž byla luminiscence intenzivní a stabilní.

Podařilo se sestavit aparaturu přesně odpovídající konkrétním požadavkům této metody a jejímu principu. Použitím standardu kyseliny L-askorbové ve vodném prostředí bylo umožněno převést koncept metody do reálné formy.

Proměření kalibrační závislosti bylo podmíněno nastavením specifických průtokových rychlostí zúčastněných reagentů.

Nakonec byla úspěšně provedena analýza reálných vzorků. Analyzováno bylo široké spektrum vzorků přírodních i produkty syntetické. Jejich TAC byly vzájemně porovnány.

V testovaných vzorcích byly zahrnuty bílé, zelené i černé čaje různých firem (dohromady byla stanovena TAC šesti čajů sáčkových, tří sypaných a jednoho sypaného mletého čaje). Výsledky bylo potvrzeno, že závisí nejen na druhu čaje, ale i na jeho kvalitě a způsobu přípravy. Analýzou byly získány výsledky podle obecného předpokladu, u bílých čajů byla naměřena vyšší TAC než u většiny čajů zelených, u černých čajů nižší než u bílých a zelených čajů (v přepočtu na gram suchých vzorků).

Analýzou vzorků kávy byly získány vysoké hodnoty TAC v přepočtu na gram suchého produktu. Tyto hodnoty byly až dvojnásobně vyšší než ty, které byly naměřeny u vzorků čaje; tedy byly samozřejmě i vyšší hodnoty TAC připravených nápojů. Podobné závěry lze najít i u výsledků jiných experimentů.¹⁶⁷ Byly zaznamenány pouze drobné rozdíly v naměřených hodnotách různých druhů kávy; u rozpustné kávy byly hodnoty TAC vyšší.

Naměřené hodnoty TAC vzorků piv byly srovnatelné s výsledky TAC slabších zelených čajů.

U obou druhů červených vín byla prokázána vysoká TAC podle obecných předpokladů, malý rozdíl v naměřených hodnotách byl způsoben odlišnou kvalitou a odrůdami vína. Získané hodnoty TAC analyzovaných vzorků jsou 3-4 krát vyšší než

hodnoty naměřené u čajových extraktů, což je opět ztotožnitelné s jinými experimentálními výsledky.¹⁶⁸

Z ovocných šťáv byly pro analýzu vybrány čerstvé šťávy z citrónu a kiwi kvůli jejich vysokému obsahu vitamínu C. Byly získány velmi vysoké hodnoty antioxidační aktivity, v případě citrónu srovnatelné s TAC kvalitního červeného vína.

TAC připravených čokoládových extraktů byla naměřena velmi vysoká. V tabulce kvalitní čokolády s vysokým podílem kakaové sušiny (70%) bylo obsaženo větší množství antioxidantů než v 10 šálcích kvalitního bílého čaje a zhruba stejné množství antioxidantů jako v 1,2 litru kvalitního červeného vína, známého pro své antioxidační účinky.

Výsledky analýz jsou porovnatelné s výsledky podobných experimentů, uváděných v jednotkách VCEAC.^{168, 169}

Analýza vodných roztoků doplňků stravy byla u některých produktů komplikována přítomností ve vodě nerozpustné matrice a antioxidanty rozpustnými pouze v tucích. Velmi dobré výsledky, ve shodě s údaji uvedenými výrobcem, byly naměřeny při analýze pilulky Celaskonu, obsahující pouze vitamín C. Byla tak potvrzena spolehlivost stanovení touto metodou. Malé množství selenu obsaženého v tabletce firmy Walmark nebylo možno detegovat kvůli vyšší mezi detekce této metody.

6 ZÁVĚR

Podařilo se úspěšně vyvinout metodu pro stanovení TAC průtokovou injekční analýzou s chemiluminiscenční detekcí a aplikovat ji na reálné vzorky. Vzhledem ke spolehlivým výsledkům získaným z analýzy je možné tuto metodu doporučit pro stanovení antioxidantů ve vodných roztocích, zejména přírodních vzorků antioxidantů. Je snadno přístupnou metodou. Nevýhodou může být náročnost přípravy chemiluminiscenčního roztoku. Tato metoda není vhodná pro stanovení celkových množství antioxidantů menších než $15 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a analýzu vzorků vyžadujících použití organických rozpouštědel.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

-
- ¹ Růžička J.: *Flow Injection Analysis* [DVD] 4th Edition., 2009
- ² Inczedy J., Lengyel T., Ure.A.M.: *Compendium of Analytical Nomenclature. Definitive rules 1998* (the “Orange Book”). 3.vydání. Oxford, Blackwell Science 1998
- ³ A. D. McNaught and A. Wilkinson. *Compendium of Chemical Terminology: IUPAC Recommendations* (the “Gold Book”), 2nd ed., Oxford, Blackwell Science 1997
- ⁴ Zagatto E.A.G, van Staden J.F., Maniasso N., Stefan R.I., Marshall G.D.: Information Essential For Characterizing a Flow-based Analytical System (IUPAC Technical Report) *Pure and Applied Chemistry* **74**:4, 585-592 (2002)
- ⁵ Toth K., Štulík K., Kutner W., Fehér Z., Lindner E.: Electrochemical Detection in Liquid Flow Analytical Techniques: Characterization and Classification (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **76**:6, 1119-1138 (2004)
- ⁶ Cerdà V., Estela J.M., Forteza R., Cladera A., Becerra E., Altimira P., Sitjar P.: Flow techniques in water analysis. *Talanta* **50**:4, 695-705 (1999)
- ⁷ Růžička J., Hansen E.H.: Flow Injection Analysis part I. A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis. *Analytica Chimica Acta* **78**, 145-157 (1975)
- ⁸ Kolev S., McKelvie I.: *Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*. University of Melbourne and Monash University. Australia 2008
- ⁹ Fletcher P., Andrew K.N., Calokerinos A.C., Forbes S., Worsfold P.J.: Analytical applications of flow injection with chemiluminescence detection—a review. *Luminiscence* **16**:1, 1-23 (2001) DOI: 10.1002/bio.607
- ¹⁰ Marquette CH.A., Blum L.J.: Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **385**:3, 546-554 (2006) DOI: 10.1007/s00216-006-0439-9
- ¹¹ Ruzicka, J., Marshall, G.D: Sequential injection: A new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta* **237**:2, 329-343 (1990)
- ¹² Van Staden J.F., van Staden R.I.S.: Flow injection analysis systems with different detection devices and other related techniques for the in vitro and vivo determination of dopamine as neurotransmitter. A review. *Talanta*. In Press, Corrected Proof (2012)
Dostupné z URL: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.05.017>>
- ¹³ Paseková H., Polášek M., Solich P.: Sekvenční injekční analýza. *Chemické Listy* **93**, 354 – 359 (1999)
- ¹⁴ Ruzicka J.: Retro-review of flow-injection analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **27**:5, 390-393 (2008)

-
- ¹⁵ Miró M., Hansen E.H.: Recent advances and future prospects of mesofluidic Lab-on-a-Valve platforms in analytical sciences – A critical review. *Analytica Chimica Acta*. In Press. Corrected Proof. (2012)
Dostupné z URL: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.03.049>>
- ¹⁶ Wang B., Anslyn E.V.: *Chemosensors. Principles, Strategies and Applications*. New Jersey, John Wiley & Sons 2011, s.231-232
- ¹⁷ Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: *Spektrometrické analytické metody I*. Praha, Nakladatelství Karolinum 2004
- ¹⁸ Valeur B., Berberan-Santos M.N.: A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory. *Journal of Chemical Education* **88**:6, 731–738 (2011)
- ¹⁹ Barni F., Lewis S.W., Berti A., Miskelly G.M., Lago G.: Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta* **72**:3, 896-913 (2007)
- ²⁰ White E.H., Zafirou O., Kagi H.H., Hill J.H.M.: Chemiluminescence of Luminol: The Chemical Reaction. *Journal of the American Chemical Society* **86**:5, 940-941 (1964) DOI: 10.1021/ja01059a050
- ²¹ White E.H., Burseu M.M.: Chemiluminescence of Luminol and Related Hydrazides: The Light Emission Step. *Journal of the American Chemical Society* **86**:5, 941-942 (1964) DOI: 10.1021/ja01059a051
- ²² Raut V.M., Kholam Y.B., Kondawar S.B., Koinkar P.: Synthesis and Characterization of Luminol Persulphate Chemiluminescence in Aqueous Amines. *International Journal of Modern Physics: Conference Series* **6**, 162-165 (2012) DOI: 10.1142/S201019451200311X
- ²³ Paul D.B.: Recent analytical developments using chemiluminescence in solution. *Talanta* **25**:7, 377-382 (1978)
- ²⁴ US Pat 20090166595A1. Schrimmer et al.: *Enhanced Chemiluminescent Lighting Formulation and Element*. 2.7.2009
- ²⁵ Chasteen T.G., Sam Houston State University: *The Chemiluminescence Home Page: Chemiluminescent Emitters*. Dostupné z URL: <http://www.shsu.edu/~chm_tgc/chemilumdir/emitters.html> [cit 15.3. 2012]
- ²⁶ Glinski R.J., Taylor C.D.: Effects of isotopic substitution on the chemiluminescence spectra obtained during the reaction of F₂ with CS₂. *Chemical Physics Letters* **155**:4-5, 511-512 (1989)
- ²⁷ Spurlin S.R., Yeung E.S.: On-line chemiluminescence detector for hydrogen sulfide and methyl mercaptan. *Analytical Chemistry* **54**:2, 318-320 (1982) DOI: 10.1021/ac00239a040

-
- ²⁸ Sutton D.G, Westberg K.R., Melzer J.E: Chemiluminescence detector based on active nitrogen for gas chromatography of hydrocarbons. *Analytical Chemistry* **51**:9, 1399-1401 (1979) DOI: 10.1021/ac50045a013
- ²⁹ Toby S.: Chemiluminescence in the reactions of ozone. *Chemical Reviews* **84**:3, 277-285 (1984) DOI: 10.1021/cr00061a003
- ³⁰ Glinski R.J., Mishalanie E.A., Birks J.W.: Molecular emission spectra in the visible and near IR produced in the chemiluminescent reactions of molecular fluorine with organosulfur compounds. *Journal of Photochemistry* **37**:2, 217-231 (1987)
- ³¹ Getty R.H., Birks J.W.: A Chemiluminescence Detector for Gas Chromatography with Selectivity for Iodine. *Analytical Letters* **12**:5, 469-476 (1979) DOI:10.1080/00032717908055698
- ³² Seitz W.R.: Chemiluminescence and bioluminescence analysis: fundamentals and biomedical applications. *Crc Critical Reviews in Analytical Chemistry* **13**:1, 1-58 (1981)
- ³³ Totter J.R: Light production in alkaline mixtures of reducing agents and dimethylbiacridylum nitrate. *Photochemistry and Photobiology* **22**:5, 203-211 (1975) DOI: 10.1111/j.1751-1097.1975.tb06737.x
- ³⁴ Rubinstein I., Martin Ch.R., Bard A.J.: Electrogenerated chemiluminescent determination of oxalate. *Analytical Chemistry* **55**:9, 1580-1582 (1983) DOI: 10.1021/ac00260a030
- ³⁵ Finlayson ,B.J., Pitts Jr. J.N., Atkinson R.: Low-pressure gas-phase ozone-olefin reactions. Chemiluminescence, kinetics, and mechanisms. *Journal of The American Chemical Society* **96**:17, 5356-5367 (1974)
- ³⁶ T.A. Gough T.A., Webb K.S., Eaton R.F.: Simple chemiluminescent detector for the screening of foodstuffs for the presence of volatile nitrosamines. *Journal of Chromatography A* **137**:2, 293-303 (1977)
- ³⁷ Kenner R.D., Ogryzlo E.A.: *Chemi- and Bioluminescence*. New York. Marcel Dekker 1985. s.139
- ³⁸ Glinski R.J, Mishalanie E.A., Birks J.W.: Selenoformaldehyde phosphorescence observed in the reaction of molecular fluorine with dimethyl diselenide. *Journal of The American Chemical Society* **108**:3, 531-532 (1986) DOI: 10.1021/ja00263a042
- ³⁹ Greaves J.C., Garvin D.: Chemically induced molecular excitation – excitation spectrum of the nitric oxide-ozone system. *Journal of Chemical Physics* **30**:1, 348-349 (1959) DOI: 10.1063/1.1729934
- ⁴⁰ Lindon J.C., Tranter G.E., Holmes J.L.: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry. Volume 2*. London, Academic Press 2000, s.1207
- ⁴¹ Klopff L.L., Nieman T.A.: Effect of iron(II), cobalt(II), copper(II), and manganese(II) on the chemiluminescence of luminol in the absence of hydrogen peroxide. *Analytical Chemistry* **55**:7, 1080-1083 (1983) DOI: 10.1021/ac00258a023

-
- ⁴² Roda A., Guardigli M.: Analytical chemiluminescence and bioluminescence: latest achievements and new horizons. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **402**:1, 69-76 (2012)
- ⁴³ Tsuji A., Maeda M., Matsumoto M., Kricka L.J., Stanley P.E.: *Bioluminescence and Chemiluminescence. Progress and Perspectives*. USA. World Scientific Publishing CO PTE LTD. 2004
- ⁴⁴ Goldenson J.: Detection of Nerve Gases by Chemiluminescence. *Analytical Chemistry* **29**:6, 877-879 (1957) DOI: 10.1021/ac60126a004
- ⁴⁵ Aizawa M.: Immunosensors for clinical analysis. *Advances in clinical chemistry* **31**, 247-275 (1994) DOI: 10.1016/S0065-2423(08)60337-6
- ⁴⁶ Fluorofory v biomedicině. Handbook of Fluorescent Probes and Research Products Dostupné z URL: <<http://www1.lfl.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>> [cit 16.7.2012]
- ⁴⁷ Alho H., Leinonen J.: Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods. *Methods in Enzymology* **299**, 3-15 (1999)
- ⁴⁸ Prior R.L., Cao G.: In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine* **27**:11-12, 1173-1181 (1999)
- ⁴⁹ Whitehead T.P., Thorpe G.H.G., Maxwell S.R.J.: Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Analytica Chimica Acta* **266**:2, 265-277 (1992)
- ⁵⁰ Halliwell B.: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. *Lancet* **344**:8924, 721-724 (1994)
- ⁵¹ Darley-Usmar V., Halliwell B.: Blood radicals. Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions and vascular system. *Pharmaceutical Research* **13**:5, 649-662 (1996)
- ⁵² Pláteník J.: Reaktivní formy kyslíku v lidském těle, antioxidační ochrana. Ústav lékařské biochemie 1.LF UK. Dostupné z URL: <http://che1.lfl.cuni.cz/html/ROS_CZE_081209b.pdf> [cit 15.4. 2012]
- ⁵³ Aruoma O.I.: Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **75**:2, 199-212 (1998)
- ⁵⁴ Romano A.D., Serviddio G., de Mattheis A., Bellanti F., Vendemiale G.: Oxidative stress and aging. *Journal of Nephrology* **23**:15, S29-S36 (2010)
- ⁵⁵ Reilly, P.: Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Amer.J.Surg* **161**, 488-503 (1991)
- ⁵⁶ Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy Chuong: Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health *International Journal of Biomedical Science* **4**:2, 89-96 (2008)

-
- ⁵⁷ Devasagayam T.P.A., Tilak J.C., Boloor K.K., Sane K.S., Saroj S Ghaskadbi S.S., Lele R.D.: *Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects* Dostupné z URL: <http://www.japi.org/october2004/R-794.pdf> [cit 20.4. 2012]
- ⁵⁸ Kehrer J.P.: The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**:1, 43-50 (2000)
- ⁵⁹ Bankson D.D, Kestin M., Rifai N.: Role of free radicals in cancer and atherosclerosis. *Clinics in Laboratory Medicine* **13**:2, 463-480 (1993)
- ⁶⁰ Wanasundara P.K.J.P.D., Shahidi F.: *Antioxidants: Science, Technology and Applications. Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. 6th Edition. Hoboken, Wiley Interscience 2005, s. 431-489
- ⁶¹ German J.B: Food processing and lipid oxidation. *Advances in experimental medicine and biology* **459**, 23–50 (1999). doi:10.1007/978-1-4615-4853-9_3.
- ⁶² Cooke M.S., Evans M.D., Mistry N., Lunec J.: Role of the dietary antioxidants in the prevention of in vivo oxidative DNA damage. *Nutrition Research Reviews* **15**, 19-41 (2002)
- ⁶³ Sies, Helmut. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental physiology* **82**: 2, 291–5 (1997).
- ⁶⁴ Food Standards Agency: *Current EU approved additives and their E Numbers*. Dostupné z URL: <http://www.food.gov.uk/safereating/additivesbranch/enumberlist#h_4> [cit. 14.3.2012]
- ⁶⁵ Hussain H.H., Babic G., Durst T., Wright J.S., Flueraru M, Chichirau A., Chepelev L.L.: Development of Novel Antioxidants: Design, Synthesis, and Reactivity *The Journal of Organic Chemistry*: **68**:18, 7023-7032 (2003)
DOI: 10.1021/jo0301090
- ⁶⁶ Le Roux A., Kuzmanovski I., Habrant D., Meunier S., Bischoff P., Nadal B., Sophie A.-L. Thetiot-Laurent, Le Gall T., Wagner A., Novič M.: Design and Synthesis of New Antioxidants Predicted by the Model Developed on a Set of Pulvinic Acid Derivatives. *Journal of Chemical information and modeling* **51**:12, 3050–3059 (2011) DOI: 10.1021/ci200205d
- ⁶⁷ Kaki S.S., Grey C., Adlercreutz P.: Bioorganic synthesis, characterization and antioxidant activity of esters of natural phenolics and α -lipoic acid. *Journal of Biotechnology* **157**:2, 344- -349 (2012)
- ⁶⁸ Yanishlieva N. V.; Marinova E. , Pokorný J.: Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology* **108**: 9, 776–793 (2006). DOI: 10.1002/ejlt.200600127
- ⁶⁹ Padayatty, Sebastian J.; Katz, Arie; Wang, Yaohui; Eck, Peter; Kwon, Oran; Lee, Je-Hyuk; Chen, Shenglin; Corpe, Christopher et al.: Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition* **22**:1, 18–35 (2003)

-
- ⁷⁰ Schorah, CJ; Downing, C; Piripitsi, A; Gallivan, L; Al-Hazaa, AH; Sanderson, MJ; Bodenham, A: Total vitamin C, ascorbic acid, and dehydroascorbic acid concentrations in plasma of critically ill patients. *The American journal of clinical nutrition* **63**:5, 760–5(1996)
- ⁷¹ Sm Shigeoka, S.; Ishikawa, T; Tamoi, M; Miyagawa, Y; Takeda, T; Yabuta, Y; Yoshimura, K: Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**:372, 1305–19 (2002). doi:10.1093/jexbot/53.372.1305
- ⁷² Noctor G, Foyer CH: ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 249–279 (1998) doi:10.1146/annurev.arplant.49.1.249.
- ⁷³ Bakaev V.V.; Duntau A.P.: Ascorbic acid in blood serum of patients with pulmonary tuberculosis and pneumonia. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **8**:2, 263-266 (2004)
- ⁷⁴ Hemilä H., Louhiala P.: Vitamin C for preventing and treating pneumonia. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **1** (2007) doi:10.1002/14651858.CD005532.pub2
- ⁷⁵ Chen X., Touyz R.M., Park J.B., Schiffrin E.L.: Antioxidant Effects of Vitamins C and E Are Associated With Altered Activation of Vascular NADPH Oxidase and Superoxide Dismutase in Stroke-Prone SHR *Hypertension* **38**, 606-611 (2001) doi: 10.1161/hy09t1.094005
- ⁷⁶ Schindler T. H., Magosaki N., Jeserich M., Olschewski M, Nitzsche E., Holubarsch Ch., Solzbach U., Just H.: Effect of Ascorbic Acid on Endothelial Dysfunction of Epicardial Coronary Arteries in Chronic Smokers Assessed by Cold Pressor Testing. *Cardiology* **94**, 239-246 (2000) DOI: 10.1159/000047324
- ⁷⁷ Myint P.K., Luben R.N., Welch A.A., Bingham S.A., Wareham N.J., Khaw K.T.: Plasma vitamin C concentrations predict risk of incident stroke over 10 y in 20 649 participants of the European Prospective Investigation into Cancer Norfolk prospective population study. *The American Journal of Clinical Nutrition* **87**:1, 64–69 (2008)
- ⁷⁸ Arrigoni O., De Tullio M.C.: Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta* **1569**:1-3, 1-9 (2002)
- ⁷⁹ Hosokawa N., Nagata K.: Procollagen binds to both prolyl 4-hydroxylase/protein disulfide isomerase and HSP47 within the endoplasmic reticulum in the absence of ascorbate. *Febs Letters* **466**:1, 19-25 (2000)
- ⁸⁰ Hemilä, Harri; Chalker, Elizabeth; Douglas, Bob; Hemilä, Harri . Vitamin C for preventing and treating the common cold. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **3** (2007) doi:10.1002/14651858.CD000980.pub3
- ⁸¹ Heiner, Kathryn A; Hart, Marie A.; Martin, Gore L.; Rubio-Wallace, Sherrie: Examining the evidence for the use of vitamin C in the prophylaxis and treatment of the common cold.

Journal of the American Academy of Nurse Practitioners **21**:5, 295–300 (2009)
doi:10.1111/j.1745-7599.2009.00409.x.

⁸² Stanner S.A., Hughes J., Kelly C.N., Buttriss J.: A review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis. *Public Health Nutrition* **7**:3, 407-422 (2004)

⁸³ Close G., Ashton T., Cable T., Doran D., Holloway C., McArdle F., MacLaren D.: Ascorbic acid supplementation does not attenuate post-exercise muscle soreness following muscle-damaging exercise but may delay the recovery process. *British Journal of Nutrition* **95**:5, 976–81 (2006) doi:10.1079/BJN20061732

⁸⁴ NetZel M., NetZel G., Tian Q., Schwartz S., Konczak I.: Native Australian fruits - a novel source of antioxidants for food. *Innovative food science & emerging technologies* **8**:3, 339-346 (2007) DOI: 10.1016/j.ifset.2007.03.007

⁸⁵ Konczak I., Zabaras D., Dunstan M., Aguas P.: Antioxidant capacity and hydrophilic phytochemicals in commercially grown native Australian fruits. *Food Chemistry* **123**: 4, 1048–1054 (2010)

⁸⁶ McCance, Widdowson's: *The Composition of Foods*, Sixth Summary edition, Royal Society of Chemistry Cambridge, Food Standard Agency, 2002

⁸⁷ USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24: *Vitamin C, total ascorbic acid (mg) Content of Selected Foods per Common Measure*. Dostupné z URL: <<https://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/SR24/nutrlst/sr24a401.pdf>>
[cit 29.4.2012]

⁸⁸ Smirnoff N., Wheeler G. L.: Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **35**: 4, 291–314 (2000)
doi:10.1080/10409230008984166

⁸⁹ Wang X., Quinn P. J.: Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research* **38**:4, 309–36 (1999) doi:10.1016/S0163-7827(99)00008-9

⁹⁰ Traber M.G., Atkinson J.: Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine* **43**:1, 4–15 (2007) doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024

⁹¹ Herrera E., Barbas C.: Vitamin E: Action, metabolism and perspectives. *Journal of Physiology and Biochemistry* **57**:2, 43–56 (2001) doi:10.1007/BF03179812

⁹² Stampfer M.J., Hennekens C.H., Manson J.E., Graham A. C., Rosner B., Willett W.C.: Vitamin E Consumption and the Risk of Coronary Disease in Women. *The New England Journal of Medicine* **328**, 1444-1449 (1993)

⁹³ Rimm E.B., Stampfer M.J., Ascherio A., Giovannucci E., Colditz G.A., Willett W.C.: Vitamin E Consumption and the Risk of Coronary Heart Disease in Men. *The New England Journal of Medicine* **328**, 1450-1456 (1993)

-
- ⁹⁴ Prasad K.N., Prasad J.E.: Vitamin E and cancer prevention: recent advances and future potentials. *Journal of the American College of Nutrition* **11**:5, 487-500 (1992)
- ⁹⁵ Yusuf S., Dagenais G., Pogue J., Bosch J., Sleight P.: Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *The New England Journal of Medicine* **342**:3, 154-160 (2000)
- ⁹⁶ Bjelakovic G., Nikolova D., Gluud L.L., Simonetti R.G., Gluud C.: Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012, Issue 3. Art. No.: CD007176. DOI: 10.1002/14651858.CD007176.pub2
- ⁹⁷ Lonn E., Bosch J., Yusuf S., Sheridan P., Pogue J., Arnold J.M., Ross C., Arnold A., Sleight P., Probstfield J., Dagenais G.R.: Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA : the Journal of the American Medical Association* **293**:11, 1338-1347 (2005)
- ⁹⁸ Miller E.R., Pastor-Barriuso R., Dalal D., Riemersma R.A., Appel L.J., Guallar E.: Meta-Analysis: High-Dosage Vitamin E Supplementation May Increase All-Cause Mortality. *Annals of Internal Medicine* **142**:1, 37-46 (2005)
- ⁹⁹ Office of Dietary Supplements, National Institutes of Health: *Dietary Supplement Fact Sheet: Vitamin E*. Dostupné z URL: <<http://ods.od.nih.gov/factsheets/vitamine.asp>> [cit 8.5.2012]
- ¹⁰⁰ USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 20: *Vitamin E (alpha-tocopherol) (mg) Content of Selected Foods per Common Measure*. Dostupné z URL: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/SR20/nutrlist/sr20w323.pdf>> [cit 8.5.2012]
- ¹⁰¹ Nagao A.: Absorption and metabolism of dietary carotenoids. *BioFactors* **37**:2, 83-87 (2011) doi: 10.1002/biof.151
- ¹⁰² El-Sayed M. Abdel-Aal, Young J.C.H., Rabalski I., Pierre Hucl P., Fregeau-Reid J.: Identification and Quantification of Seed Carotenoids in Selected Wheat Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**:3, 787-794 (2007)
- ¹⁰³ Terao J., Minami Y., Bando N.: Singlet molecular oxygen-quenching activity of carotenoids: relevance to protection of the skin from photoaging. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **48**:1, 57-62 (2011)
- ¹⁰⁴ Böhm F., Edge R., Truscott T.G.: Interactions of dietary carotenoids with singlet oxygen (O-1(2)) and free radicals: potential effects for human health. *Acta biochimica Polonica* **59**:1, 27-30 (2012)
- ¹⁰⁵ Di Mascio P., Kaiser S., Sies H.: Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **274**:2, 532-538 (1989)

¹⁰⁶ Sies H., Stahl W.: Carotenoids and UV Protection. *Photochemical and photobiological Sciences* **3**:8, 749-752 (2004) DOI: 10.1039/b316082c

¹⁰⁷ Stahl W., Sies H.: Carotenoids and Flavonoids Contribute to Nutritional Protection against Skin Damage from Sunlight *Molecular Biotechnology* **37**:1, 26-30 (2007) DOI: 10.1007/s12033-007-0051-z

¹⁰⁸ Afaq F., Mukhtar H.: Botanical Antioxidants for Skin Protection: An Overview. *Nutrition for Healthy Skin: Strategies for clinical and cosmetic practice* 51-63 (2011) DOI: 10.1007/978-3-642-12264-4_5

¹⁰⁹ Sánchez-Moreno C., Plaza L., Ancos de B., Cano M.P.: Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**, 430-439 (2003)

¹¹⁰ Grassmann J., Schnitzler W.H., Habegger R.: Evaluation of different coloured carrot cultivars on antioxidative capacity based on their carotenoid and phenolic contents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **58**, 603-611 (2007)

¹¹¹ Prasad K.N., Chew L.Y., Khoo H.E., Yang B., Azlan A., Ismail A.: Carotenoids and antioxidant capacities from *Canarium odontophyllum* Miq. Fruit. *Food Chemistry* **124**:4, 1549-1555 (2010)

¹¹² Ziegler RG: A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. *The Journal of Nutrition*: **119**:1, 116-122 (1989)

¹¹³ Sharoni Y, Linnewiel-Hermoni K., Khanin M., Salman H., Veprik A., Danilenko M., Levy J.: Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: A review. *Molecular Nutrition & Food Research. Special Issue: Carotenoids in Nutrition and Health - Developments and Future Trends* **56**:2, 259-269 (2012)

¹¹⁴ Tanaka T., Shnimizu M., Hisataka Moriwaki H.: Cancer Chemoprevention by Carotenoids. *Molecules* **17**, 3202-3242 (2012)

¹¹⁵ Chatterjee, Mary; Roy, Kaushik; Janarthan M.; Das, Subhadeep; Chatterjee, Malay: Biological Activity of Carotenoids: Its Implications in Cancer Risk and Prevention. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **13**:1, 180-190 (2012)

¹¹⁶ Druesne-Pecollo N., Latino-Martel P., Norat T., Barrandon E., Bertrais S., Galan P., Hercberg S.: Beta-carotene supplementation and cancer risk: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *International Journal of Cancer* **127**:1, 172-184 (2009)

¹¹⁷ Tanvetyanon T., Bepler G.: Beta-carotene in multivitamins and the possible risk of lung cancer among smokers versus former smokers. *Cancer* **113**:1, 150-157 (2008)

¹¹⁸ Druesne-Pecollo N., Latino-Martel P., Norat T., Barrandon E., Bertrais S., Galan P. and Hercberg S.: Beta-carotene supplementation and cancer risk: a systematic review and

metaanalysis of randomized controlled trials. *International Journal of Cancer* **127**:1, 172–184 (2010) doi: 10.1002/ijc.25008

¹¹⁹ Rao A.V., Rao L.G.: Carotenoids and human health. *Pharmacological Research* **55**:3, 207–216 (2007)

¹²⁰ Linus Pauling Institute, Oregon State University: *Micronutrient Information center: Carotenoids*. Dostupné z URL: <<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/carotenoids>> [cit 11.5.2012]

¹²¹ Glenn E. Bartley and Pablo A. Scolnik: Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health. *The Plant Cell* **7**:7, 1027–1038 (1995)

¹²² Meléndez-Martínez A.J., Vicario I.M., Heredia F.J.: Application of Tristimulus Colorimetry To Estimate the Carotenoids Content in Ultrafrozen Orange Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**:25, 7266–7270 (2003)
DOI: 10.1021/jf034873z

¹²³ Shewmaker Ch.K., Sheehy J.A., Daley M., Colburn S., Ke D.Y.: Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *The Plant Journal* **20**:4, 401–412 (1999)

¹²⁴ Roberts R.L., Green J., Lewis B.: Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. *Clinics in Dermatology* **27**:2, 195–201 (2009)

¹²⁵ Fernandez-Garcia E., Carvajal-Lerida I., Jaren-Galan M., Garrido-Fernandez J., Perez-Galvez A., Hornero-Mendez D.: Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International* **46**:2, 438–450 (2012)

¹²⁶ Sanjib Bhattacharya: Are we in the polyphenols era? *Pharmacognosy Research* **3**:2, 147 (2011) doi: 10.4103/0974-8490.81966

¹²⁷ Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L.: Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **79**:5, 727–747 (2004)

¹²⁸ King A., Young G.: Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association* **99**:2, 213–218 (1999)

¹²⁹ Mgr. Lucie Mandelová: Antimutagenní aktivita obsahových látek v zelenině a v ovoci. Masarykova Univerzita Brno, 2006

¹³⁰ M. Pilar Almajano M.P., Carbó R., Jiménez J.A.L., Gordon M.H.: Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry* **108**:1, 55–63 (2008)

¹³¹ Kreft I., Fabjan N., Yasumoto K.: Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. *Food Chemistry* **98**:3, 508–512 (2006)

-
- ¹³² Karen A. Cooper K.A., Donovan J.L., Waterhouse A.L., Williamson G.: Cocoa and health: a decade of research. *British Journal of Nutrition* **99**:1, 1-11 (2008) doi: 10.1017/S0007114507795296
- ¹³³ Bedini A., Zanolli V., Zanardi S., Bersellini U., Dalcanale E., Suman M.: Rapid and Simultaneous Analysis of Xanthines and Polyphenols as Bitter Taste Markers in Bakery Products by FT-NIR Spectroscopy. *Food Analytical Methods* (2012) DOI: 10.1007/s12161-012-9405-7
- ¹³⁴ Nichols J.A., Katiyar S. K.: Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of Dermatological Research* **302**:2, 71-83 (2010) DOI: 10.1007/s00403-009-1001-3
- ¹³⁵ Joseph J.A., Shukitt-Hale B., Casadesus G.: Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compound. *The American Journal of Clinical Nutrition* **81**:1, 313S-316S (2005)
- ¹³⁶ Ferrario A., Luna M., Rucker N., Wong S., Gomer C. J.: Pro-apoptotic and anti-inflammatory properties of the green tea constituent epigallocatechin gallate increase photodynamic therapy responsiveness. *Lasers in Surgery and Medicine* **43**:7, 644–650 (2011) doi: 10.1002/lsm.21081
- ¹³⁷ Siddiqui M.A., Saquib Q., Ahamed M., Ahmad J., Al-Khedhairi A.A., Abou-Tarboush F.M., Musarrat J.: Effect of Trans-resveratrol on rotenone-induced cytotoxicity in human breast adenocarcinoma cells. *Toxicology International* **18**:2, 105-110 (2011) doi: 10.4103/0971-6580.84261
- ¹³⁸ Ndiaye M., Philippe C., Mukhtar H., Ahmad N.: The grape antioxidantresveratrol for skin disorders: Promise, prospects, and challenges. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **508**:2, 164-170 (2011)
- ¹³⁹ Manach C., Williamson G., Morand Ch., Scalbert A., Rémésy Ch.: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* **81**:1, 230S-242S (2005)
- ¹⁴⁰ Lotito S.B., Frei B.:Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology and Medicine* **41**:12, 1727–1746 (2006) DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.033
- ¹⁴¹ Godycki-Cwirko M., Krol M., Krol B., Zwolinska A., Kolodziejczyk K., Kasielski M., Padula G., Greboczek J., Kazimierska P., Miatkowski M., Miatkowski J., Nowak D: Uric acid but not apple polyphenols is responsible for the rise of plasma antioxidant activity after apple juice consumption in healthy subjects. *Journal of The American College of Nutrition* **29**:4, 397-406 (2010)
- ¹⁴² Julia Barciela, Carlos Herrero, Sagrario García-Martín, Rosa M. Peña: A brief study of the role of selenium as antioxidant. *Elektronik Journal of Enviromental, Agricultural and*

Food Chemistry. Dostupné z URL:

<http://ejeafche.uvigo.es/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=432&Itemid=33>[cit 2.6.2012]

¹⁴³ Tapiero H., Townsend D.M., Tew K.D.: The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **57**:3-4, 134-144 (2003)

¹⁴⁴ Levy M.L., Bray T.M.: The Antioxidant Function of Dietary Zinc and Protection Against Neural Disorders. *Linus Pauling Institute Research Report* (2003) Dostupné z URL:
<<http://lpi.oregonstate.edu/ss03/zinc.html>>
[cit 3.6. 2012]

¹⁴⁵ Mates J.M, Perez-Gomez C., De Castro I.N: Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* **32**:8, 595-603 (1999)

¹⁴⁶ Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H.: Glutathion: The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **57**:3-4, 145-155 (2003)

¹⁴⁷ Stevanović J., Borozan S., Jović S., Ignjatović I.: Antioxidative defence. *Veterinarski glasnik* **65**:3-4, 247-256 (2011)

¹⁴⁸ Delanghe J.R., Langlois M.R.: Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. *Clinica Chimica Acta* **312**:1-2, 13-23 (2001)

¹⁴⁹ Gutteridge J.M.C.: The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **917**:2, 219-223 (1987)

¹⁵⁰ Sautin Y.Y., Imaram W., Kim K.M., Angerhofer A., Henderson G., Johnson R.: Uric Acid and Oxidative Stress. *Studies on Renal Disorders*. Book Series: *Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*, p.149-159 (2011) DOI: 10.1007/978-1-60761-857-7_8

¹⁵¹ Sedlak T.W., Saleh M., Higginson D.S., Paul B.D., Juluri K.R., Snyder S.H.: Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* **106**: 13, 5171-5176 (2009) DOI: 10.1073/pnas.0813132106

¹⁵² Liu Y., Liu J., Tetzlaff W., Paty D.W., Cynader M.S.: Biliverdin reductase, a major physiologic cytoprotectant, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Free Radical Biology and Medicine* **40**:6, 960-967 (2006)

¹⁵³ Bentinger M., Brismar K., Dallner G.: The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion* **7**:S, S41-S50 (2007) DOI: 10.1016/j.mito.2007.02.006

-
- ¹⁵⁴ Packer L., Witt E., Tritschler H.J.: Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine* **19**:2, 227–250 (1995)
- ¹⁵⁵ Prokai L., Prokai-Tatrai K., Perjési P., Simpkins J.W.: Mechanistic Insights into the Direct Antioxidant Effects of Estrogens. *Drug Development Research* **66**:2, 118-125 (2005)
- ¹⁵⁶ Bonnefont-Rousselot D., Collin F.: Melatonin: Action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology* **278**:1, 55-67 (2010)
- ¹⁵⁷ Grzegorz Bartosz G.: Total Antioxidant Capacity. *Advanced in Clinical Chemistry* **37**, 219-292 (2003)
- ¹⁵⁸ Somogyi A., Rosta K., Pusztai P., Zsolt Tulassay Z., Nagy G., : Antioxidant measurements. *Physiological Measurement* **28**:4, R41–R55 (2007) doi:10.1088/0967-3334/28/4/R01
- ¹⁵⁹ Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A.: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* **84**:4, 407-412 (1993)
- ¹⁶⁰ Cort W. M., Scott J. W., Araujo M., Mergens W. J., Cannalunga M.A., Osadca M., Harley H., D. R. Parrish D. R., Pool W. R.: Antioxidant activity and stability of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **52**:6, 174-178 (1975)
- ¹⁶¹ Verzellonia E., Tagliazucchi D., Conteb A.: Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chemistry* **105**:2, 564-571 (2007)
- ¹⁶² Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C.: Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Analytica Chimica Acta* **558**:1-2, 310-318 (2006)
- ¹⁶³ Kim D.O., Lee K.W., Lee H.J., Lee C.Y.: Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:13, 3713-3717 (2002) DOI: 10.1021/jf020071c
- ¹⁶⁴]¹⁶⁴ Fleming D., University of Bristol: *The Chemiluminiscence of Luminol* Dostupné z URL: <<http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/fleming/index.htm>> [cit. 7.7.2012]
- ¹⁶⁵ Šimůnek O: Chemiluminiscence. Dostupné z URL:<http://chemiluminiscence.xf.cz/chemiluminiscence_II_final.pdf> [cit.7.7. 2012]

¹⁶⁶ Sariahmetoğlu M., Wheatley R.A., Çakıcı.İ, Kanzık İ, Townshend A.: Flow Injection Analysis for Monitoring Antioxidant Effects on Luminol Chemiluminescence of Reactive Oxygen Species. *Analytical Letters* **36**:4, 749-765 (2003)

¹⁶⁷ Richelle M, Tavazzi I., Offord E.: Comparison of the Antioxidant Activity of Commonly Consumed Polyphenolic Beverages (Coffee, Cocoa, and Tea) Prepared per Cup Serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**:7, 3438 – 3442 (2001)

¹⁶⁸ Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee Ch.Y: Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**:25, 7292-7295 (2003)

¹⁶⁹ Ock Kyoung Chun O.K., Kim D.O, Smith N., Schroeder D., Han J.T., Lee Ch.Y.: Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**: 10, 1715-1724 (2005)